

Aus der Dermatologischen Universitätsklinik und Poliklinik
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

„Identifizierung von *Candida*-Spezies und –Stämmen durch den Nachweis von polymorphen DNA-Regionen in der PCR„

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Manuel Vieira Dias Pinto de Andrade

aus: Luanda

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-J. Tietz
2. Prof. Dr. med. H. C. Korting
3. Frau Prof. Dr. med. H. Bernardt

Datum der Promotion: 12.07.1999

Abstract

A PCR fingerprinting approach and a RFLP analysis of the amplified ITS region were used to differentiate *Candida* species and strains as well as to assess genetic and epidemiological relationships of strains belonging to the same species. The PCR fingerprinting amplifies anonymous DNA sequences sampled throughout the whole genome. The ITS region is part of the ribosomal operon which occurs in tandem arrays of nearly 50-100 copies in one cell.

1.a. Both methods were used to identify clinical isolates of *C. famata* and *C. guilliermondii* which were difficult to differentiate with routine methods. Out of 37 ambiguous isolates 31 could be identified as *C. guilliermondii*, 3 as *C. famata* and the other 3 were not identifiable. Biochemical typing (Api 32 C V.1) identified only 23 out of 31 *C. guilliermondii* and 1 out of 3 *C. famata* whereas 14 isolates were misidentified or not identified at all.

1.b. By using the PCR fingerprinting technique strains of *C. albicans* with altered phenotypes could be identified at species level. Atypical isolates which did not express those characteristics which are thought to be typical for *C. albicans* like the formation of chlamydospores, the ability to metabolise the amino sugars glucosamine and N-acetylglucosamine as the sole carbon source or to assimilate 2-ketogluconate and xylose showed the PCR patterns typical for *C. albicans*. Our study revealed that biochemical and morphological methods of species identification are limited if some of the key reactions fail.

2. We investigated the variability of phenotypic and genotypic properties of 6 different *C. albicans* populations from different countries (Angola, Madagascar, Portugal and Germany) including atypical strains. Except for the atypical strains only very little phenotypical variation was observed. However, 87 different genotypes were found among the 212 strains. The relatedness of the fingerprint-genotypes were analysed by measuring genetic distances with the UPGMA method.

3. Vaginal isolates of *Candida* spp. obtained from patients with recurrent episodes of vaginitis were compared with isolates from different body locations of the women and from their male partners. It has been shown that strain exchanges between the partners occur, that the original strain with or without minor genotypic changes can persist despite of the therapy, but also that reinfection by a new strain is possible.

The identification of an ethiological agent by the mycological diagnostic laboratory is of clinical and epidemiological importance. Molecular biological methods should not replace well established conventional methods but they can supplement the identification of fungal pathogens in specialised reference laboratories if diagnosis cannot be achieved easily by conventional diagnostic procedures.

□ Keywords: *Candida*, polymorphism, PCR, identification, ITS-region

Zusammenfassung

Für die Identifizierung bzw. Differenzierung von *Candida*-Spezies und -Stämmen sowie für die Bestimmung der genetischen und epidemiologischen Verwandtschaft von Stämmen der gleichen Spezies wurde eine PCR-Fingerprint-Technik und eine RFLP-Analyse der amplifizierten ITS-Region angewandt. Das PCR-Fingerprinting amplifiziert anonyme Sequenzen in der chromosomalen DNA, die über das gesamte Genom verteilt sind. Die ITS-Region ist Bestandteil des ribosomalen Operons, welches in ca. 50-100 Kopien/Zelle vorhanden ist.

1.a. Beide molekularbiologischen Verfahren wurden zur Unterscheidung von routinemäßig schwer differenzierbaren klinischen *Candida famata* und *Candida guilliermondii*-Isolaten genutzt. Von insgesamt 37 fraglichen Stämmen konnten 31 als *C. guilliermondii* und 3 als *C. famata* identifiziert werden, die drei verbliebenen Stämme waren mit diesen Techniken nicht identifizierbar. Mit der Biochemotypie gelang nur die Zuordnung eines der 3 *C. famata*-Isolate sowie von 23 der 31 *C. guilliermondii*-Isolate. 14 Isolate wurden mit den konventionellen Methoden gar nicht oder falsch identifiziert.

1b. Mit dem PCR-Fingerprinting wurde auch die Spezieszugehörigkeit phänotypisch veränderter *Candida albicans*-Isolate überprüft. Alle atypischen Stämme, bei denen solche für *C. albicans* charakteristischen Merkmale wie die Bildung von Chlamydosporen, die Verwertung der Aminosucker Glukosamin und N-Acetylglukosamin sowie die Assimilation von 2-Ketogluconat und Xylose nicht ausgeprägt waren, wiesen die für *C. albicans* typischen Fingerprintmuster auf. Unsere Studie zeigte, daß die biochemische Typisierung an Grenzen stößt, wenn typische Stoffwechselreaktionen nicht nachgewiesen werden können.

2. Bei 6 verschiedenen *C. albicans*-Populationen aus Angola, Madagaskar, Deutschland und Portugal wurde die Variabilität phänotypischer und genotypischer Merkmale untersucht, wobei in diese Analyse auch atypische Stämme miteinbezogen wurden. Während die phänotypischen Eigenschaften, bis auf die der atypischen Stämme, kaum variierten, wurden für die insgesamt 212 *C. albicans*-Isolate 87 unterschiedliche PCR-Fingerprint-Genotypen nachgewiesen. Eine Analyse der Beziehungen zwischen den Fingerprint-Genotypen wurde mit der UPGMA-Distanz-Methode durchgeführt.

3. Weiterhin wurden *Candida*-Vaginalisolate von Patientinnen mit rezidivierenden Episoden von *Candida*-Vaginitis mit Stämmen verglichen, die aus anderen Körperregionen stammten bzw. bei ihren Partnern isoliert wurden. Es konnte gezeigt werden, daß Stammaustausche zwischen den Partnern vorkommen, ein Stamm ohne oder mit geringfügigen genotypischen Veränderungen trotz Therapie persistieren kann und daß eine Reinfektion auch durch einen neuen Stamm möglich ist.

Das Problem der Erregeridentifizierung in der mykologischen Labordiagnostik ist sowohl klinisch als auch epidemiologisch relevant. Molekularbiologische Methoden sollen gut funktionierende konventionelle Methoden zur Erregeridentifizierung nicht ersetzen, können aber bei Problemfällen eine wertvolle Ergänzung für die mykologische Diagnostik vorzugsweise in fachständigen Referenzlaboratorien darstellen.

□ Schlagwörter: *Candida*, Polymorphismus, PCR, Identifizierung, ITS-Region

**Gewidmet
Dedicatória**

meiner lieben Frau Isabel,
meinen Kindern Ivan und Mário
für ihre Treue und Geduld.
Sie mußten jahrelang auf mich verzichten,
um eine „verspätete“ aber gemeinsame
Zukunft gewährleisten zu können.

à minha estimada esposa, Isabel,
aos meus filhos Ivan e Mário,
pela sua lealdade e paciência.
Por vários anos aguentaram a separação,
para garantir um futuro comum
ainda que atrasado

INHALTSVERZEICHNIS

Abstract	iii
Zusammenfassung	iv
Gewidmet Dedicatória	v
1...	Einleitung	1
1.1	Biologie der <i>Candida</i> -Spezies.....	3
1.2	Epidemiologie der <i>Candida</i> -Infektionen	6
1.3	Verfahren zur Identifizierung von <i>Candida</i> -Spezies in der Routine- diagnostik	9
1.3.1	Mikroskopie.....	10
1.3.2	Kultur	11
1.3.3	Biochemische Diagnostik.....	12
1.3.4	Serologische Methoden	13
1.3.5	Molekularbiologische Methoden	15
1.4	Verfahren zur Stammtypisierung bei <i>Candida</i>	19
1.5	Aufgabenstellung	24
2...	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.1.1	Stämme	26
2.1.2	Primer	28
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Probengewinnung.....	29
2.2.2	Identifizierung mit konventionellen Methoden	29
2.2.2.1	Kulturelle Verfahren	29
2.2.2.2	Mikroskopie.....	29
2.2.2.3	Biochemische Differenzierung	30
2.2.2.3.1	API-System.....	30
2.2.3	Identifizierung mit molekularbiologischen Methoden	31
2.2.3.1	DNA-Präparation	31
2.2.3.2	DNA-Konzentrationsbestimmung und Lagerung der DNA-Proben	32
2.2.3.3	PCR-Fingerprinting (Polymerasekettenreaktion)	33

2.2.3.4	Amplifizierung und Restriktionsanalyse der ITS-Region	34
2.2.3.4.1	PCR zur Amplifizierung der ITS-Region	34
2.2.3.4.2	Restriktionsanalyse der ITS-Region	35
2.2.3.5	Nachweis der PCR-Produkte	35
2.2.3.5.1	Elektrophorese für das Fingerprinting	35
2.2.3.5.2	Elektrophorese des ITS-PCR-Produkts und des Restriktionsfragments	36
2.2.3.5.3	Fotografie	36
2.2.3.6	Computergestützte Analyse der PCR-Fingerprints	36
2.2.3.7	Computergestützte Auswertung der ITS-RFLP-Analysen	37
2.2.4	Chemikalien, Enzyme, Lösungen, Geräte	38
2.2.5	Rezepte	39
3...	ERGEBNISSE	41
3.1	Methoden zur konventionellen Identifizierung der <i>Candida</i> -Isolate	41
3.2	Konventionelle und molekularbiologische Identifizierung schwer differenzierbarer <i>Candida</i> -Stämme	44
3.2.1	Differenzierung von <i>C. guilliermondii</i> und <i>C. famata</i>	44
3.2.1.1	Ergebnisse konventioneller Identifizierungsmethoden	44
3.2.1.2	Ergebnisse molekularbiologischer Identifizierungsmethoden	46
3.2.1.2.1	PCR-Fingerprinting	46
3.2.1.2.2	Restriktionsanalyse der amplifizierten ITS-Region	47
3.2.1.3	Vergleich der Ergebnisse konventioneller phänotypischer und molekularbiologischer Methoden für die Identifizierung von <i>C. guilliermondii</i> und <i>C. famata</i>	49
3.2.2	Identifizierung von <i>Candida albicans</i> -Stämmen mit atypischen morphologischen und biochemischen Eigenschaften	53
3.2.2.1	Ergebnisse konventioneller Identifizierungsmethoden	53
3.2.2.2	Ergebnisse des PCR-Fingerprintings	58
3.3	Charakterisierung von <i>C. albicans</i> -Vaginalisolaten aus Afrika und Europa	60
3.3.1	Phänotypische Charakterisierung mit den in der Routinediagnostik angewendeten konventionellen Methoden	60
3.3.2	Genetische Charakterisierung mit dem PCR-Fingerprinting	61
3.4	Vergleichende Untersuchung von <i>Candida</i> -Stämmen isoliert von Patientinnen mit Vaginalcandidose und ihren Partnern	69
3.4.1	Phänotypische Charakterisierung mit den in der Routinediagnostik angewendeten konventionellen Methoden	69
3.4.2	Genetische Charakterisierung mit dem PCR-Fingerprinting	70

4...	DISKUSSION	79
4.1	Identifizierung konventionell schwer differenzierbarer <i>Candida</i> - Stämme mit molekularbiologischen Methoden	79
4.1.1	Differenzierung von <i>C. guilliermondii</i> / <i>C. famata</i> -Isolaten von der- matologischen Patienten	79
4.1.2	Identifizierung von <i>Candida albicans</i> -Stämmen mit atypischen morphologischen und biochemischen Eigenschaften	83
4.2	Vergleichende genotypische Charakterisierung von <i>C.albicans</i> - Vaginalisolaten aus Afrika und Europa	86
4.3	Vergleichende Untersuchung von <i>Candida</i> -Stämmen isoliert von Patientinnen mit Vaginalcandidose und ihren Partnern	88
5...	ZUSAMMENFASSUNG.....	92
	LITERATUR	96
	ERKLÄRUNG AN EIDES STATT.....	I
	LEBENS LAUF	II
	DANKSAGUNG	III

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Beispiele für Morphotypen von <i>Candida albicans</i> . Quelle: WWW-Server für <i>C. albicans</i> [160].	21
Abbildung 2: <i>Candida albicans</i> und non- <i>albicans</i> Arten auf dem Nährboden ALBICANS ID-Agar®	41
Abbildung 3: Mit <i>Candida</i> Arten beimpfte Reisagar-Platte	42
Abbildung 4: Auf Reisagar angezüchtet <i>C. albicans</i> mit Hyphen (H) und Chlamydosporen (C).	42
Abbildung 5: PCR-Fingerprint-Muster ausgewählter <i>C.famata</i> / <i>C.guilliermondii</i> -Isolate erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B.	47
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Gesamt-ITS-Region mit der Lokalisation der in der PCR verwendeten Primer.	48
Abbildung 7: Amplifizierung der ITS-Regionen von <i>C. guilliermondii</i> / <i>C. famata</i> mit den Primern SR6R und LR1	49
Abbildung 8: Spaltung der amplifizierten ITS-Regionen von <i>C. famata</i> und <i>C. guilliermondii</i> mit den Restriktionsendonukleasen Hae III (a) und Dde I (b).	49
Abbildung 9: Chronisch rezidivierende Onychomykose bei der Patientin S.C.	50
Abbildung 10: Stamm der Patientin S.C. ohne Pseudomyzelbildung auf Reisagar	50
Abbildung 11: PCR-Fingerprint-Muster ausgewählter <i>C.famata</i> / <i>C.guilliermondii</i> -Isolate erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B.	51
Abbildung 12: Spaltung der amplifizierten ITS-Regionen von <i>C. famata</i> und <i>C. guilliermondii</i> mit der Restriktionsendonuklease Hae III.	51
Abbildung 13: <i>C. albicans</i> -Stämme auf Reisagar, (A) mit und (B) ohne Chlamydosporenbildung.	56
Abbildung 14: ID-32C-Profil von typischen <i>C. albicans</i> des Biotyps 1 (A) und von atypischen NAG-negativ Stämmen (B).	57
Abbildung 15 PCR-Fingerprint-Muster 2KG- und XYL-negativer <i>Candida</i> -Isolate aus Deutschland erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B.	58
Abbildung 16: PCR-Fingerprint-Muster atypischer <i>Candida</i> -Isolate aus Afrika erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B.	59
Abbildung 17 PCR-Fingerprint-Muster ausgewählter <i>C. albicans</i> -Isolate aus Afrika, Deutschland und Portugal erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B.	61

Abbildung 18: Phylogenetische Beziehungen zwischen <i>C. albicans</i> -Stämmen unterschiedlicher geographischer Herkunft ermittelt mit der UPGMA-Distanz-Methode. Die statistische Relevanz der Gruppierungen wurde durch eine Bootstrap-Analyse geprüft. Nur Bootstrap-Werte höher als 50% sind in dem Dendrogramm angezeigt.	68
Abbildung 19: PCR-Fingerprint-Muster der <i>Candida</i> -Isolate von 4 gynäkologischen Patientinnen und ihren Partnern erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B	71
Abbildung 20: PCR-Fingerprint-Muster der <i>Candida</i> -Isolate von 5 gynäkologischen Patientinnen und ihren Partnern erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B	72
Abbildung 21: PCR-Fingerprint-Muster der <i>Candida</i> -Isolate von 4 gynäkologischen Patientinnen und ihren Partnern erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B	73
Abbildung 22: PCR-Fingerprint-Muster der <i>Candida</i> -Isolate von 7 gynäkologischen Patientinnen und ihren Partnern erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B	74
Abbildung 23: PCR-Fingerprint-Muster der <i>Candida</i> -Isolate von 3 gynäkologischen Patientinnen und ihren Partnern erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B	76
Abbildung 24: Vergleich der von den Vaginalisolaten verschiedener Patientinnen erhaltenen PCR-Fingerprint-Muster (Primer T3B)	78

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Medizinisch relevanten <i>Candida</i> -Arten (nach M. G. Rinaldi, modifiziert).....	3
Tabelle 2. Anamorph-teleomorphe Verwandtschaften für medizinisch relevante <i>Candida</i> -Spezies (nach M. G. Rinaldi).....	4
Tabelle 3: Methoden für die Direktuntersuchung von Proben zum Nachweis von <i>Candida</i> spp. im mikrobiologischen Routinelabor	11
Tabelle 4: Molekularbiologische Methoden für die Identifizierung von <i>Candida</i> -Spezies.	16
Tabelle 5: PCR-Verfahren für den direkten Nachweis von <i>Candida</i> spp. aus Patientenmaterial.	17
Tabelle 6: Herkunft der klinischen Stämme	26
Tabelle 7: Referenzstämme	27
Tabelle 8: Verwendete Primer. Hersteller: TIB MOLBIOL, Berlin.....	28
Tabelle 9: PCR-Ansätze	33
Tabelle 10: PCR-Programme für das DNA-Fingerprint.....	33
Tabelle 11: PCR Ansatz zur Amplifizierung der gesamten ITS-Region	34
Tabelle 12: Zyklusprogramm der PCR zur Amplifizierung der gesamten ITS-Region	34
Tabelle 13: Ansatz zur enzymatischen Spaltung der amplifizierten ITS-Region mit den Restriktionsenzymen Hae III und Dde I.....	35
Tabelle 14: Verwendete Chemikalien:	38
Tabelle 15: Verwendete Geräte:	39
Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse konventioneller und molekularbiologischer Methoden für die Identifizierung fraglicher <i>C.guilliermondii</i> / <i>C.famata</i> -Isolate	45
Tabelle 17: Atypische <i>Candida</i> -Isolate aus Deutschland	53
Tabelle 18: Atypische <i>Candida</i> -Isolate aus Angola.....	54
Tabelle 19: Atypische <i>Candida</i> -Isolate aus Madagaskar	55
Tabelle 20: <i>Candida albicans</i> -Populationen aus Afrika und Europa	60
Tabelle 21: PCR-Fingerprint-Genotypen, die bei mehr als drei unterschiedlichen <i>C. albicans</i> -Stämmen nachgewiesen wurden (0 = Bande nicht vorhanden, 1 = Bande vorhanden).	64

Tabelle 22: Ergebnisse nach Biotypisierung mit konventionellen Methoden.....	69
Tabelle 23: Ergebnisse des PCR-Fingerprinting für die von gynäkologischen Patientinnen und ihren Partnern isolierten <i>Candida</i> -Stämme	77
Tabelle 24: Zusammenfassung der Daten der biochemischen Charakterisierung der Biotypen 1 und 2 von <i>C. albicans</i> sowie der atypischen Stämme aus der Mundhöhle HIV-Infizierter anhand der Prozentualtabelle der BioMerieux Datenbank (Salkin et al. 1998).....	84

1 EINLEITUNG

Das Krankheitspanorama ist einem ständigem Wechsel unterworfen. Dies wird oft zu wenig beachtet, obwohl es sehr wichtig ist. Man denke nur an die großen Seuchenzüge früherer Zeiten, an die wechselnden Prävalenzen der Syphilis und anderer sexuell übertragbarer Krankheiten, an die Zunahme der Allergien, das weltweite Verschwinden der Pocken, das "Auf und Ab" der Krätzeerkrankungen oder das fast völlige Aussterben der Malaria und der Lepra in Mitteleuropa - oder gar an die epidemiologische Situation im Falle vom AIDS ([Göttlicher 1997](#)).

Pilzinfektionen haben in den letzten zwei Jahrzehnten erheblich zugenommen. Bei Patienten ohne schwere Grunderkrankungen oder Immunschwäche treten, insbesondere in warmen Ländern, Hautinfektionen auf. *Candida*-Infektionen von Oropharynx oder Ösophagus kommen bei HIV-positiven Patienten häufig als erste Manifestation von AIDS vor. Moderne, hochpotente Antimykotika konnten die Inzidenz der Mykosen nicht entscheidend verringern, im Gegensatz zu den zumindest in Mitteleuropa durch den Einsatz von Antibiotika sowie durch die notwendigen antiepidemischen Maßnahmen weitgehend ausgerotteten bakteriellen Infektionskrankheiten wie Lepra, Pest u.a.. Das liegt offensichtlich nicht daran, daß sich Resistenzen gegen Antimykotika entwickelt hätten, wie sie bei Bakterien leider beobachtet wurden. Vielmehr ist anzunehmen, daß verschiedene Faktoren, die zum Anstieg von Pilzinfektionen führen, in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen haben. So z.B. scheint sich die Prävalenz der Vulvovaginalmykose trotz des effizienten Einsatzes der Antimykotika bei ca. 10 Prozent zu stabilisieren ([Göttlicher 1997](#)).

Während die Bäcker- und Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae*, als das eukaryontische Äquivalent des Bakteriums *Escherichia coli*, eine hervorragende Stellung im Hinblick auf die Kenntnisse zur Biologie, zur Genetik und zur potentiell möglichen biotechnologischen Nutzung bei Pilzen einnimmt, besteht kaum ein Zweifel darüber, welcher Organismus diese Stelle unter den medizinisch relevanten Pilzen besetzt. Die Hefe *Candida albicans* ist eindeutig der wichtigste Erreger von Humanmykosen, wobei die Krankheitsbilder von unkomplizierten Hautinfektionen, wie z.B. der Windeldermatitis, bis hin zu fatalen, systemischen Infektionen bei immungeschwächten Patienten reichen ([Merlino et al. 1998](#), [Shepherd et al. 1985](#)).

C. albicans ist vor allem als Haupterreger der Vaginitis bekannt, die bei großen Teilen

der weiblichen Population irgendwann im Laufe des Lebens einmal auftritt. Die Tatsache, daß die Sterblichkeitsrate von Infektionen, die durch diese Hefe bei Tumorpatienten und insbesondere bei neutropenischen Patienten verursacht werden, unakzeptierbar hoch bleibt, ist ein großes Problem bei der medizinischen Versorgung dieser Patienten. Neuerdings ist *C. albicans* als ernstzunehmender Erreger von Infektionen der Schleimhäute von HIV-Infizierten und AIDS-Patienten bekannt geworden.

Mehr als über jeden anderen humanpathogenen Pilz ist in der medizinischen Literatur über *C. albicans* geschrieben worden, über seine Biologie, seine Pathogenität, seine Virulenzfaktoren sowie über seine Wechselwirkungen mit den Abwehrmechanismen des Wirts. Studien, die die Wirt-Parasit-Beziehungen untersuchen, haben einerseits zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie dieser Mykosen und andererseits der Abwehrmechanismen des Wirts geführt.

Gegenwärtig wird eine steigende Inzidenz von Mykosen, die von anderen *Candida*-Spezies wie z.B. *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* und *C. krusei* verursacht sind, beobachtet ([Hazen 1995](#)). Diese Hefen sind ebenfalls wichtige Erreger von „opportunistischen“ Mykosen bei immunsupprimierten Patienten.

Bedingt durch die allgemeine Zunahme von Pilzinfektionen wächst einerseits das Interesse an der Entwicklung von leistungsfähigen, nichttoxischen Antimykotika. Andererseits besteht nach wie vor ein großer Bedarf an der Entwicklung von diagnostischen Techniken, die *Candida*, auch bei invasiven Erkrankungen, einfach, genau, schnell und reproduzierbar nachweisen können.

1.1 Biologie der *Candida*-Spezies

Neben *C. albicans*, als dem wichtigsten humanpathogenen Vertreter der Gattung *Candida*, sind auch andere Spezies dieser Gattung als Erreger von Infektionen bei Mensch und Tier beschrieben. Die [Tabelle 1](#) zeigt eine Liste der medizinisch relevanten *Candida*-Spezies.

Tabelle 1: Medizinisch relevanten *Candida*-Arten (nach M. G. Rinaldi, modifiziert)

<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout 1923
<i>Candida albicans</i> var. <i>stellatoidea</i> (Jones et Martin 1938) Langeron et Guerra
<i>Candida catenulata</i> Diddens et Lodder
<i>Candida ciferrii</i> Kreger-van Rij
<i>Candida</i> (<i>Torulopsis</i>) <i>glabrata</i> (Anderson) Meyer et Yarrow 1978
<i>Candida guilliermondii</i> (Castellani) Langeron et Guerra 1938
<i>Candida haemuloni</i> (van Uden et Kolipinski) Meyer et Yarrow 1978
<i>Candida kefyr</i> (Beijerinck) van Uden et Buckley 1970
<i>Candida krusei</i> (Castellani) Berkhout 1923
<i>Candida lipolytica</i> (Harrison) Diddens et Lodder
<i>Candida lusitanae</i> van Uden et do Carmo-Sousa 1959
<i>Candida norvegensis</i> (Dietrichson) van Uden et Farinha ex van Uden et Buckley
<i>Candida parapsilosis</i> (Ashford) Langeron et Talice 1932
<i>Candida pulcherrima</i> (Lindner) Windisch
<i>Candida rugosa</i> (Anderson) Diddens et Lodder
<i>Candida tropicalis</i> (Castellani) Berkhout 1923
<i>Candida utilis</i> (Heneberg) Lodder et Kreger-van Rij
<i>Candida viswanathii</i> Sandhu et Randhawa 1962
<i>Candida zeylanoides</i> (Castellani) Langeron et Guerra

Die Spezies der Gattung *Candida*, für die keine sexuellen Vermehrungsformen bekannt sind, werden zu den Fungi imperfecti geordnet. Für einige *Candida*-Spezies sind die entsprechenden teleomorphen (sexuelle/perfekte) Partner bekannt (Tabelle 2). Sie gehören zu den Ascomyzeten.

Tabelle 2. Anamorph-teleomorphe Verwandtschaften für medizinisch relevante *Candida*-Spezies (nach M. G. Rinaldi)

Anamorph	Teleomorph
<i>Candida ciferrii</i>	<i>Stephanoascus ciferrii</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Yamadazyma guilliermondii</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>Marxianus</i>
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkya orientalis</i>
<i>Candida lusitanae</i>	<i>Clavispora lusitanae</i>
<i>Candida norvegensis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>
<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Candida utilis</i>	<i>Pichia jadinii</i>

Nicht alle Mykologen werden mit dieser Nomenklatur einverstanden sein. Einige Autoren z.B. bevorzugen *Pichia guilliermondii* anstelle von *Yamadazyma guilliermondii* sowie *Hansenula jadinii* statt *Pichia jadinii*.

Durch *Candida*-Spezies hervorgerufene Krankheiten haben unterschiedliche Bezeichnungen erhalten. Eine angemessene Terminologie ist Candidose oder *Candida*-Mykose. Der letzte Begriff gilt allgemein für durch *Candida* spp. verursachte Infektionen, während für den Befall eines bestimmten Organs der Begriff „Candidose“ in Verbindung mit der Bezeichnung des Organes (z.B. Oralcandidose) oder der allgemeine Begriff „itis“ zusammen mit dem befallenen Organ (z.B. *Candida*-Vaginitis) verwendet wird. Der früher verwendete Begriff „Moniliasis“ sollte nicht mehr für durch *Candida*-Organismen verursachte Infektionen verwendet werden, da es eine eigene Pilzgattung *Monilia* gibt, welche nichts mit *Candida* spp. oder mit Candidose zu tun hat.

Bei *Candida*-Spezies findet man sowohl Hefezellen mit typischen Sproßungen (Blastokonidien oder Blastosporen genannt) als auch fadenförmige Strukturen. Bei den letzteren handelt es sich um elongierte Sproßzellen (Blastokonidien), die aneinander gereiht

bleiben und dadurch echten Hyphen ähneln. Ein Geflecht von Pseudohyphen bezeichnet man als Pseudomyzel. Im klinischen Material findet man bei den meisten *Candida*-Spezies sowohl Hefeformen als auch Pseudohyphen. Manche *Candida* Arten sind auch in der Lage echtes Myzel zu bilden wie z. B. *C. albicans*. Es wird angenommen, daß die Anwesenheit von fadenförmige Strukturen in den Geweben für eine Invasion des Pilzes spricht, während die Beobachtung von nur bzw. vorwiegend Sproßzellen auf eine reine Kolonisation hindeutet. Wie immer bei allen biologischen Phänomenen, ist dieses Kriterium nicht völlig zuverlässig und sollte nicht als unantastbare Regel angesehen werden.

C. albicans, *C. stellatoidea* und *C. dubliniensis* sind als einzige Spezies in der Lage, bei Inkubation in humanem oder tierischem Serum sehr schnell (1 bis 2 Stunden bei 37 °C) Keimschläuche zu bilden, was vermutlich mit ihrer Fähigkeit zur Gewebeinvasion korreliert. Mutanten, die diese Eigenschaft verloren haben, können im Mausmodell im Gegensatz zu Wildstämmen keine experimentelle Vaginitis erzeugen ([Sobel et al. 1984](#)). Bei anderen Spezies werden die Keimschläuche erst nach längerer Bebrütung (mehr als 2 Stunden) beobachtet. Die Fähigkeit, im Serum Keimschläuche bilden zu können, beweist einmal mehr den bei *C. albicans* beobachteten Dimorphismus, d.h. die Möglichkeit der Umwandlung von der Hefe- zur Myzelphase.

Eine typische Eigenschaft von *Candida albicans* ist die Fähigkeit, in-vitro sogenannte Chlamydosporen zu bilden. Diese werden meistens größer als die Sproßzellen und besitzen eine widerstandsfähige Zellwand. Man nimmt an, daß Chlamydosporen ruhende Wachstumsformen sind, da sie bei Nährstoffmangel gebildet werden. Die Eigenschaft von *C. albicans*, bei Anzucht in einem halbanaeroben Milieu auf geeigneten Nährböden, z.B. Reisagar unter Deckglas, Chlamydosporen zu produzieren, wird von klinischen Laboratorien als zusätzlicher Test für die Identifizierung dieser Spezies verwendet. Nur *Candida albicans* var. *stellatoidea* und auch die neu beschriebene Spezies *C. dubliniensis*, die phänotypisch *C. albicans* stark ähnelt, bilden unter diesen Bedingungen ebenfalls Chlamydosporen aus ([Sullivan et al. 1995](#), [Timmins et al. 1988](#)). Andere medizinisch relevante *Candida*-Arten sind dazu nur sehr selten in der Lage. Bei *C. tropicalis* wurden unter den entsprechenden Bedingungen manchmal ovale Chlamydosporen beobachtet, die sich von den abgerundeten bei *C. albicans* unterscheiden.

C. albicans-Isolate sind diploid und heterozygot. Obwohl *C. albicans* die Fähigkeit zur sexuellen Vermehrung verloren hat, zeichnet sich diese Spezies durch eine hohe gene-

tische Variabilität und phänotypische Instabilität aus, was auf mitotische Rekombinationen, chromosomale Rearrangements oder auch auf Mutationen zurückgeführt wird ([Scherer & Magee 1990](#)).

1.2 Epidemiologie der *Candida*-Infektionen

Candida-Spezies sind auf menschliche und tierische Reservoirs begrenzt, obwohl sie gelegentlich auch aus der Umwelt, z.B. aus dem Boden und aus Lebensmitteln, isoliert werden.

Die Ausbreitung der Pilze auf Menschen, Tiere, Lebensmittel, Boden und die gesamte Umwelt geht wahrscheinlich von humanen und tierischen Quellen aus. *Candida*-Organismen sind Bestandteil der Normalflora im Magen-Darm-Trakt, welcher beim Menschen vermutlich das hauptsächliche Habitat von *Candida* spp. darstellt. Die Prävalenz der Hefen scheint bei gesunden Menschen geringer als bei aus verschiedenen Gründen stationär aufgenommenen Patienten zu sein. Die Isolierungsrate von Hefen aus dem Mund gesunder Menschen variiert z.B. in 9 verschiedenen Studien zwischen 2 bis 37% (Mittelwert 6%) im Vergleich zu 13 bzw. 76% (Mittelwert 47%) bei stationären Patienten ([Odds, 1987](#)). Der weibliche Genitaltrakt und auch Katheterurin sind häufig mit *Candida*-Spezies kolonisiert. Die gesunde Haut wird dagegen nur sehr selten besiedelt, kleine Verletzungen oder Läsionen der Haut können diesen Prozeß allerdings fördern.

Von den ca. 150 bis 200 bekannten *Candida*-Spezies ([Odds, 1987](#)) wurden bisher 17 als Erreger von Mykosen beim Menschen beschrieben. Sowohl bei mukokutanen als auch bei tief lokalisierten Infektionen wird *Candida albicans* am häufigsten isoliert. In Abhängigkeit vom Patientengut findet man in verschiedenen Kliniken zunehmend häufiger auch andere Spezies von *Candida*, insbesondere als Erreger von Organmykosen. Je stärker das zelluläre Immunsystem des Patienten (insbesondere T-Lymphozyten) beeinträchtigt ist, desto häufiger treten solche *Candida*-Arten, wie *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitanae*, *C. krusei* und *C. glabrata*, auf. Dabei ist die Letalität bei Infektionen durch diese Spezies (z.B. *C. lusitanae*) manchmal höher als die bei *C. albicans*-Infektionen.

Non-*C. albicans*-Arten sind oft weniger empfindlich gegenüber Antimykotika ([Tietz and](#)

Czaika 1999, Rex et al. 1995). Es kann daher während der antimykotischen Therapie zur Selektion derartiger Spezies kommen, die dann therapeutische Probleme bereiten. Eine Spezies-Differenzierung ist deshalb nicht nur aus epidemiologischer Sicht sondern auch für die Auswahl einer geeigneten Therapie von Bedeutung. (Gräser et al. 1997, Kunzelmann et al. 1996)

Obwohl *C. albicans* die am häufigsten isolierte Spezies in praktisch allen epidemiologischen Studien ist (Pfaller 1995, 1989), ist erst wenig über den Grad der Stammvariation und über die Beziehungen zur Fähigkeit, eine spezifische Körperregion zu besiedeln, bekannt. Vermutet werden intraspezies Unterschiede in:

- der Fähigkeit, der Stämme an verschiedene zelluläre und künstliche Oberflächen zu adhären,
- der Fähigkeit, auf verschiedene pathophysiologische Veränderungen des Wirtes mit erhöhter Myzelbildung zu reagieren,
- der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Antimykotika, und
- der Fähigkeit, unterschiedliche Mengen an Proteasen und Phospholipasen zu produzieren, die ihrerseits als Virulenzmerkmale von Bedeutung sind.

Candida-Infektionen werden meist endogen erworben. Für die Ausprägung des Krankheitsbildes sind in erster Linie Wirtsfaktoren verantwortlich, aber vermutlich ist auch die vorhandene Keimzahl von Bedeutung (Boerlin et al. 1995a, Van Belkum et al. 1994, Clemons et al. 1991, Reagan et al. 1990, Whelan et al. 1990, Scherer & Stevens 1987). Bei der epidemiologischen Charakterisierung von klinischen Isolaten fanden diese Autoren keine Zusammenhänge zwischen *Candida*-Stämmen, die bei verschiedenen Patienten isoliert wurden. Diese Ergebnisse sprechen für eine endogene Ursache der Infektion, obwohl sich in der letzten Zeit Berichte über nosokomiale (exogene) Übertragungen, insbesondere auf Intensivstationen, mehren (D'Antonio et al. 1998, Robert et al. 1995, Schmid et al. 1995, Voss et al. 1995). Die wichtigste Rolle spielen dabei kontaminierte Hände von Ärzten und Pflegepersonal. Bauer et al. (1990) haben die relative Bedeutung verschiedener Übertragungsmechanismen für Mikroorganismen in Intensivstationen untersucht. Dabei waren Luftproben immer negativ für *Candida*-Organismen. 9% der Kulturen, die von 53 Patienten erhalten wurden, waren positiv für *C. albicans*. Außerdem wurden kulturelle Untersuchungen, gezielt für *Candida*-Spezies, von den Händen von 39 Mitarbeitern durchgeführt. Bei den Ärzten wurden dabei fast doppelt so

häufig *Candida* isoliert wie beim Pflegepersonal (2,7% gegen 1,4%). Die Vermutung, daß Ärzte ein wichtiges Reservoir für Erreger nosokomialer Infektionen in Intensivstationen darstellen, wird durch diese Daten unterstützt. Es ist bekannt, daß Ärzte ihre Hände nach Kontakt mit Patienten seltener desinfizieren und daß sie während ihrer Arbeit einen direkteren Kontakt zu den Patienten haben als Pflegepersonal.

Unsere Arbeitsgruppe fand bei einer epidemiologischen Studie von *C. albicans*-Stämmen, die von Patienten verschiedener Intensivstationen der Charité sowie von gesunden stomatologischen Patienten (Kontrollgruppe) stammten, eine höhere genetische Ähnlichkeit der Isolate von den Intensivpatienten ([Schönian et al. 1993a](#)). Die meisten Isolate hatten jedoch individuelle Phänotypen, was wieder für eine endogene Ursache der Infektion oder der Kolonisation durch *C. albicans* bei diesen Patienten sprach. Es wurden jedoch auch drei Gruppen zu je zwei Patienten der gleichen Station mit identischen *C. albicans*-Stämmen gefunden. Bei einigen der stomatologischen Patienten, die Zahnimplantate erhalten hatten, konnte ein interessanter Befund erhoben werden. Obwohl normalerweise die *C. albicans*-Stämme innerhalb dieser Gruppe immer sehr heterogen waren, wurden bei mehreren Patienten, die dieselbe Sprechstunde meist in der gleichen Reihenfolge besuchten, auch identische Stämme gefunden. Als Ursache dieser Übertragung in der Zahnarztpraxis wurde die mangelhafte Desinfektion einer stomatologischen Fräse, die bei allen Patienten verwendet wurde, vermutet ([Schönian et al. 1996](#)). Auch diese Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, daß iatrogene Faktoren eine Rolle bei Übertragung von *Candida* spielen können.

Verschiedene epidemiologische Studien lieferten Hinweise dafür, daß es einerseits viele verschiedene Stämme von *C. albicans* gibt, daß aber die einzelnen Individuen häufig nur mit einem Stamm besiedelt sind, welcher über die Zeit persistiert. Invasive Erkrankungen werden in der Regel durch den besiedelnden Stamm verursacht. Besiedlungs- und Invasivstämme vom gleichen Patient können bei identischem Genotyp morphologisch unterschiedliche Kolonien aufweisen. Die letzten Daten stimmen mit dem Konzept des „phenotypic switching“ überein, welches eine Rolle beim Übergang von Besiedlung zur Invasion spielen kann.

Das „phenotypic switching“ zeigt sich als Änderungen der Koloniemorphologie (rauh, strahlenförmig, knöpfchenförmig, u.a.), in der Bildung des Myzels, der Zellform und im Stoffwechsel, unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. unter Antimykotika-Druck bei der Resistenztestung oder nach einer Inkubation bei 25° C ([Soll 1996](#), [Soll 1992](#), [Slutsky](#)

1985).

Bisher konnte noch keine Korrelation zwischen einem speziellen genetischen Typ oder einer Gruppe von Genotypen und der Virulenz von *C. albicans*-Stämmen gefunden werden (Lunel et al. 1998, McCullough et al. 1996, Meusel 1996, Schönian et al. 1993a-b).

Weitere Studien sind notwendig, um grundlegende Fragen zu der Epidemiologie von Pilzkrankheiten zu klären. Es wäre wünschenswert, daß bestimmte phänotypische oder genetische Marker gefunden werden, die mit dem Fortschreiten der Krankheit korrelieren und Ansatzpunkte für die Diagnostik und Therapie liefern, um dem Kliniker bei der Behandlung der schwersten Formen der Candidose helfen zu können.

1.3 Verfahren zur Identifizierung von *Candida*-Spezies in der Routinediagnostik

Die Strategien zur Identifizierung von *Candida* spp. sind in verschiedenen Laboratorien unterschiedlich. Für die Diagnostik der *Candida*-Infektionen stehen eine Reihe etablierter Methoden, von einfachen bis hin zu zeit- und kostenintensiven Verfahren, zur Verfügung, von denen nicht alle routinemäßig angewendet werden. Insbesondere für die neusten Methoden wie z. B. PCR-Techniken steht noch eine allgemeine Standardisierung aus. Die Identifizierung von *Candida* spp. ist notwendig, da die klinischen Manifestationen sowohl bei Schleimhautinfektion als auch bei invasiver Candidose nicht spezifisch für *Candida* spp. sind und auch von anderen Erregern verursacht sein können.

Die Bestimmung der betreffenden *Candida*-Spezies hat therapeutische und prognostische Bedeutung. Die dazu benutzten Labormethoden wurden in den letzten zwei Jahrzehnten weiterentwickelt, um einen schnelleren Nachweis von invasiven Candidosen und die rasche Einleitung einer effektiven antimykotischen Therapie zu gewährleisten. Zu diesen Methoden gehören Mikroskopie, Kultur, Biochemotypie, Serologie, Spaltung der genomischen DNA mit Restriktionsenzymen und Amplifizierung von *Candida*-Genom-Sequenzen mittels PCR.

1.3.1 Mikroskopie

Die traditionellen älteren Methoden wie die Direktmikroskopie von ungefärbten Präparaten aus flüssigen Materialien (z.B. Urine) bzw. von Gram- oder Methylenblau-gefärbten Präparaten nach Vorbehandlung mit Kaliumhydroxid, bei der alle anderen Zellen zerstört werden, haben bisher ihre Wertigkeit noch nicht verloren. Diese einfachen, schnellen und kostengünstigen Verfahren für den Nachweis von *Candida*-Hefen versagen allerdings bei niedrigen Keimzahlen und sind nicht in der Lage, zwischen verschiedenen *Candida*-Arten zu differenzieren.

Für eine Identifizierung von *Candida albicans*-Isolaten wird häufig der Keimschlauchtest angewendet. Keimschläuche entstehen bei kurzzeitiger Inkubation von *C. albicans* in humanem oder tierischem Serum durch kontinuierliche (ohne Einkerbungen) parallele Verlängerung der Zellwand und stellen eine Übergangsphase zwischen der Hefe- und der Myzelform dar. Dieser Test kann sehr schnell durchgeführt werden; Probleme bereiten jedoch falschpositive Resultate bedingt durch die Fehlinterpretation von langgezogenen Blastokonidien oder auch bedingt durch verlängerte Inkubationszeiten. Falschnegative Ergebnisse können durch ein zu großes Inokulum zustande kommen. Das macht diesen Test, zusammen mit dem Zeitfaktor, der bei genauen mikroskopischen Untersuchungen von Bedeutung ist, in Laboratorien anfällig für Fehler. Es wurde außerdem berichtet, daß bis zu 5% der *C. albicans*-Isolate im Keimschlauchtest negativ sind ([Quindos et al. 1997](#), [Salkin et al. 1987](#)).

In der
Tabelle 3 sind einige Methoden für die Direktuntersuchung von Proben zum Nachweis von *Candida* spp. dargestellt.

Tabelle 3: Methoden für die Direktuntersuchung von Proben zum Nachweis von *Candida* spp. im mikrobiologischen Routinelabor

Methode	Anwendung	Bemerkungen
Direkter Abstrichstupfer	Für praktisch alle Schleimhaut-, Flüssig- und Gewebeproben	Pilzelemente erscheinen hyalin unter dem Lichtmikroskop und können bei Phasenkontrast- oder Dunkelfeldbeleuchtung besser beobachtet werden.
Gramfärbung	Besonders geeignet für Schleimhautproben	Pilzelemente werden grampositiv gefärbt, wodurch sie sich kontrastreich vom umliegenden Material abheben, was eine einfache Identifizierung erlaubt.
Calcofluor white	Geeignet für praktisch alle Schleimhaut-, Flüssig- und Gewebeproben	Sehr sensitiv zur Identifizierung von Pilzelementen in geringen Keimzahlen; fluoreszierende Organismen sind im Kontrast zum dunklen Hintergrund leicht zu erkennen; Hintergrundtrümmer stellen einen Störfaktor dar, können aber durch Vorbehandlung mit KOH beseitigt werden. Fluoreszenzmikroskop notwendig.
Methylenblau	Haut-, Nägel- und Schleimhautproben	Gute tiefblaue Färbung der Pilzelemente, färbt aber auch die Hintergrundtrümmer. Vorbehandlung mit KOH ist notwendig.

1.3.2 Kultur

Für die Anzucht von *Candida* stehen verschiedene feste und flüssige Nährmedien zur Verfügung.

Bewährt haben sich für die primäre Anzucht die klassischen Medien Sabouraud 2%-Glukose-Agar (mit oder ohne Antibiotika) und Kimmig-Agar. Auf ihnen wachsen alle Hefen der Gattung *Candida* als elfenbeinfarbene, meist glatte Kolonien ohne Luftmyzel. Bei einer Inkubation bei 25°C werden jedoch auch Veränderungen in der Koloniemorphologie beobachtet, die als „phenotypic switching“ bezeichnet werden (Soll 1996, 1992, Slutsky 1985).

Differentialnährmedien, die eine Differenzierung unterschiedlicher *Candida*-Arten gestatten, werden von verschiedenen Herstellern angeboten.

Bei dem ALBICANS ID-Agar handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen Nährboden, welcher ein chromogenes Substrat für das für *C. albicans*-spezifische Enzym Hexosaminidase enthält. Kolonien von *C. albicans* und der engverwandten Spezies *C. dubliniensis* können durch ihre blaue Färbung direkt identifiziert werden aber nur, wenn man diese als einheitliche Spezies ansieht.

Auf CHROM-Agar-Platten können *C. albicans*/*C. dubliniensis*, *C. krusei* und *C. tropicalis* aufgrund ihrer Pigmentbildung voneinander unterschieden werden. Andere Spezies, wie z.B. *C. guilliermondii* und *C. famata*, werden nicht in ihrem Wachstum gehemmt, können aber nicht diskriminiert werden, da ihre Kolonien die gleiche Färbung aufweisen (Sullivan & Coleman 1998, Baumgartner et al. 1996, San-Milán et al. 1996, Odds & Bernaerts 1994). Solche Differentialnährmedien eignen sich besonders für die Primäridentifizierung von *Candida*-Stämmen und die Erkennung von Mischkulturen.

Wie bereits schon vorher beschrieben (S. 5), gilt die Bildung von Chlamydosporen bei Anzucht auf Reisagar-Platten als spezifischer Nachweis für *C. albicans*. Andere *Candida*-Spezies, wie z.B. *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* bilden auf Reisagar Pseudohyphen, was ebenfalls für ihre Diagnostik genutzt wird. Durch ihre typische Chlamydosporenbildung auf dem Reisagar können bereits die Biotypen 1 und 2 (*C. stellatoidea*) von *C. albicans* sowie die *C. albicans* sehr eng verwandte Spezies *C. dubliniensis* von anderen *Candida*-Spezies unterschieden werden.

1.3.3 Biochemische Diagnostik

Candida-Isolate, bei denen keine Chlamydosporen nachweisbar sind, werden einer weiteren Differenzierung mit biochemischen Methoden unterzogen.

Die biochemische Identifizierung von *Candida*-Spezies beruht auf unterschiedlicher Assimilation bzw. Fermentation von Kohlenhydratsubstraten. Die Assimilation ist die Fähigkeit eines Organismus (nachgewiesen durch Wachstum) bestimmte Komponenten als einzige Energiequelle für sein Wachstum in Anwesenheit von Sauerstoff zu nutzen. Fermentation ist die Fähigkeit eines Organismus definierte Komponenten in Abwesen-

heit von Sauerstoff mit dem Ziel der Energiegewinnung zu verwerten (durch Gasbildung und pH-Veränderung nachgewiesen). Die Kohlenhydratassimilationsteste API-20C und -32C sind die am häufigsten eingesetzten Identifizierungssysteme für Hefen. Es gibt zwar andere schnell durchführbaren Systeme von verschiedenen Herstellern, die für den Nachweis der häufig isolierten Hefen auch geeignet sind, bei denen aber Probleme mit seltener vorkommenden Hefen auftreten.

1.3.4 Serologische Methoden

Mit Hilfe des indirekten Hämagglutinations-Testes, der Immunfluoreszenz, des Enzymimmunoassays oder des Radioimmunoassays lassen sich Antikörper gegen *C. albicans* nachweisen. Die Bewertung der Ergebnisse ist allerdings schwierig, da auch Gesunde grenzwertige Antikörpertiter gegen *Candida* bilden können. Somit ist es nicht immer möglich, Besiedlung und Infektion voneinander zu unterscheiden. Bei immunkompetenten Patienten ist ein Titeranstieg am ehesten diagnostisch verwertbar. Aber gerade bei den immunsupprimierten Patienten, die besonders von einer invasiven Candidose bedroht sind, läßt sich in der Regel keine adäquate Immunantwort erwarten. In solchen Fällen, können serologische Tests für die Antigen-Bestimmung nützlicher sein.

Die neuesten Fortschritte in der Antigenreinigung, in der Produktion monoklonaler Antikörper, beim Epitop-Mapping, wie auch in DNA-Rekombinationstechniken und in der PCR-Methodologie haben neue Möglichkeiten für die Diagnostik invasiver Pilzinfektionen eröffnet. Potentielle Marker für eine invasive Candidose sind z.B. Zellwandantigene, wie die Mannane, *Candida*-Metabolite, insbesondere d-Arabinitol und zytoplasmatische *Candida*-Antigene wie beispielsweise eine immundominante *Candida*-Enolase.

Große Hoffnungen haben Tests geweckt, mit deren Hilfe Pilz-Antigene oder Metabolite in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden können. Aufgrund der niedrigen Konzentration zirkulierender Antigene bei vielen Infizierten, sind hoch sensitive Tests erforderlich.

Die Zellwände von *Candida albicans*, der am besten untersuchten Spezies, enthalten die Polysaccharide Mannane und Glukan, Mannoproteine, Chitin und Proteine. Glukan, der wichtigste Bestandteil und die Mannoproteine stellen mindestens 80% und Chitin ca. 0,6% der Zellwand dar. Weder Glukan noch Chitin wirken als Antigen. Die Zellwandproteine sind wichtig für die Adhärenz an verschiedenen Oberflächen und sind

differenzierter bei *C. albicans* als bei anderen Hefespezies und bei Pseudohyphen als bei Blastosporen ([Kwon-Chung & Bennett 1992](#)).

Candida-Mannan, ein für die Adhäsion wichtiges Polysaccharid der Zellwand, ist ein potentielles Immunogen. Praktisch alle Humansenen enthalten IgG-Antikörper gegen dieses Antigen, bereits seit dem passiven Transfer von mütterlichen Antikörpern. Daher sind serologische Tests für den Nachweis von Anti-Mannan-Antikörper, wie allgemein die meisten serologischen Testverfahren in der Mykologie, in ihrer Sensitivität und Spezifität sehr eingeschränkt ([Sander 1997](#)). Außerdem muß bei der Bestimmung von Anti-*Candida*-Antikörpern in Abhängigkeit vom Alter ein normaler Durchseuchungstiter berücksichtigt werden und die relative Insensitivität und die Notwendigkeit an seriellen Bestimmungen haben die diagnostische Nützlichkeit dieses Tests erheblich limitiert ([Greenfield et al. 1983](#)). Der alleinige Einsatz der Serologie zur Diagnostik einer Candidose ist sicherlich nicht möglich. Bei Immunsupprimierten ist der Antikörpernachweis oft nicht zuverlässig. Hier sollte besonders auf den Nachweis von *Candida*-Antigen geachtet werden. Bei Patienten mit disseminierter Candidose wurden zirkulierende Mannan-Antigene in der Regel als Präfinalereignisse nachgewiesen, d.h. zu spät um von diagnostischem Wert zu sein. Außerdem die ELISA- und Latextests zur Bestimmung des Mannanantigens im Serum mangeln an Sensitivität was genauso wie bei der Antikörperbestimmung auch die diagnostische Nützlichkeit dieses Tests erheblich limitiert.

Verschiedene oberflächliche Proteine von *Candida albicans* wurden charakterisiert. Unter diesen hebt man

- die „secreted acid Proteinase“
- die „heat -shock proteins“ und
- die Enolase hervor, die immunogenische Eigenschaften besitzt. Gegen die Letztere wurden schon monoklonale Antikörper hergestellt und es wurde ein Testkit zum Nachweis von Serum-Enolase-Antigen bei Patienten mit invasiver Candidose eingeführt ([Mason et al. 1989](#)), welcher allerdings später vom Markt genommen wurde.

Der Cand-Tec®-Test (Ramco Laboratories, Houston) ist ein kommerziell verfügbarer Latex-Agglutinationstest zum Nachweis von hitzelabilen Glykoproteinen. In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben, was die Empfindlichkeit betrifft; sie schwankt zwischen 50% und 70% wenn als Grenzwert die Serumverdünnung von 1:4 herangezogen

wird. Erhöht man den Grenzwert auf 1:8, sinkt die Empfindlichkeit auf 30% oder 40%, die Spezifität wird dadurch allerdings verbessert. Falsch-positive Resultate werden durch den Rheumafaktor und auch eine Kolonisierung der Schleimhaut verursacht. So geht aus verschiedenen Studien hervor, daß 42% bis 44% der kolonisierten Patienten einen Titer von 1:4 oder mehr und 15% einen Titer von 1:8 hatten ([Sanchez et al. 1992](#)). Gesamtbeurteilung: Gerade in letzter Zeit stellen die Ergebnisse verschiedener Studien den verhältnismäßig teuren Test in Frage.

1.3.5 Molekularbiologische Methoden

Für den molekularbiologischen Nachweis der unterschiedlichen Infektionserreger werden vor allem spezifische DNA- oder RNA-Sonden, die an komplementäre Abschnitte in der zu untersuchenden DNA hybridisieren und durch geeignete Markierungen sichtbar gemacht werden können, und die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), bei der ausgewählte Sequenzen in der DNA amplifiziert und detektiert werden, genutzt. Eine für den Direktnachweis der Erreger im biologischen Material ausreichende Empfindlichkeit wird allerdings mit der PCR erreicht. Fluoreszenzmarkierte DNA- oder RNA-Sonden haben meist Bedeutung für den mikroskopischen Nachweis der Erreger in Gewebeproben nach in situ-Hybridisierung ([Lischewski 1995](#)).

Die [Tabelle 4](#) zeigt eine Liste von verwendeten molekularbiologischen Methoden für die Identifizierung von *Candida*-Spezies.

Tabelle 4: Molekularbiologische Methoden für die Identifizierung von *Candida*-Spezies.

Anwendung	Technik
Allgemein	PCR Hybridisierung
Direkt aus Material	PCR Nachweis der spezifischen Amplifikation <ul style="list-style-type: none"> . Sequenzierung . Hybridisierung . Restriktionsverdau . PCR-EIA
Stammtypisierung / Differenzierung ausgehend von Reinkultur	PCR Sequenzierung Hybridisierung RAPD Restriktionsverdau

Die PCR basiert auf wiederholten Zyklen von Denaturierung der Doppelstrang-DNA, der Anlagerung definierter Startermoleküle (Primer) und der Synthese neuer DNA-Stränge durch das Enzym Taq-Polymerase. Die so erfolgte Amplifikation der zu testenden Sequenz führt zu einer im Vergleich zu anderen Methoden deutlich höheren Sensitivität des Nachweises.

Die bisher beschriebenen PCR-Verfahren für den Nachweis von *Candida* spp. nutzen unterschiedliche Zielsequenzen, wie beispielsweise Abschnitte der nukleären wie auch der mitochondrialen ribosomalen DNA, multi-copy-Genen, die für das Aktin oder das Hitzeschockprotein 90 kodieren, und das single-copy-Gens für das Enzym Cytochrom P-450-Lanosterol-a-Demethylase (Morace et al. 1997, Van Deventer et al. 1995, Holmes et al. 1994, Maiwald et al. 1994, Makimura et al. 1994, Crampin & Matthews 1993, Hopfer et al. 1993, Kann 1993, Miyakawa et al. 1993, Niesters et al. 1993, Olsson et al. 1993, Burgener-Kairuz et al. 1994, Miyakawa et al. 1992, Buchman et al. 1990). Nur wenige dieser Nachweissysteme sind jedoch in der Lage, andere *Candida*-Spezies als *C. albicans* nachzuweisen. *Candida*-PCR-Nachweise wurden bisher aus unter-

schiedlichen klinischen Materialien, wie Blut, Liquor, Pleura, Galle, Bronchiallavage, Trachealsekret, Sputum, Urin, Eiter, Peritonealflüssigkeit, Wundflüssigkeit, und Vaginalabstrich, berichtet. In [Tabelle 5](#) sind bisher publizierte PCR-Nachweisverfahren für *Candida* einschließlich ihrer Spezifität und der erreichten Sensitivitäten aufgeführt.

Tabelle 5: PCR-Verfahren für den direkten Nachweis von *Candida* spp. aus Patientenmaterial.

Zielsequenz	Spezifität	Sensitivität KBE/ ml	Quelle
Cytochrom P-450-Lanosterol-a-Demethylase	<i>Candida</i> spp.	100 - 200*	[11]
	<i>C. neoformans</i>		[12]
	<i>Trichosporon beigeli</i>		[70]
Aktin	<i>Candida</i> spp.	100 ?	[35]
HSP 90	<i>C. albicans</i>	100	[15]
	<i>C. krusei</i>		
	<i>C. glabrata</i>		
	<i>C. guilliermondii</i>		
	<i>C. parapsilosis</i>		
mt DNA repeat EO3	<i>C. albicans</i>	100	[68, 69]
18 S rDNA	Pilze	150	[53, 54, 74, 148]
		10	[32]
non-transcribed spacer	<i>C. albicans</i>	20	[31]
5 S rDNA	alle Hefen	4	[146]
SAP-Gene	<i>C. albicans</i>	1-4	[20]
18 S rDNA	<i>Candida</i> spp.	1	[18]
	<i>Aspergillus</i> spp.		

mt DNA: mitochondriale DNA; rDNA: ribosomale RNA-Gene; HSP: heat shock protein; SAP: secreted aspartic proteinase.

* Dieses Ergebnis wurde mit einer „nested“ PCR erzielt, bei der das Amplifikat einer ersten PCR dann in einem zweiten Ansatz nochmals amplifiziert wird.

Jeder PCR-Nachweis besteht aus drei wesentlichen Arbeitsschritten:

- a) der Probenaufbereitung (DNA-Extraktion),
- b) der Amplifizierung geeigneter Zielsequenzen und
- c) der Charakterisierung (Detektion) des amplifizierten Produkts.

Die Angaben zur Empfindlichkeit in [Tabelle 5](#) beziehen sich immer auf das detektierte Amplikon, d.h. nach Überprüfung der Identität des amplifizierten Produkts bzw. nach erfolgter Speziesidentifizierung bei einer PCR mit universellen Primern. Diese Detektion der Amplifikationsprodukte erfolgte meist durch eine Spaltung mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen ([Maiwald et al. 1994](#), [Niesters et al. 1993](#), [Miyakawa et al. 1992](#)), oder durch eine meistens nicht radioaktiv Hybridisierung mit spezifischen internen Oligonukleotidsonden ([Van Deventer et al. 1995](#), [Makimura et al. 1994](#), [Burgener-Kairuz et al. 1994](#), [Hopfer et al. 1993](#)). Bei der letzten Methode wird nochmals eine Steigerung der Empfindlichkeit um etwa einen Faktor von 10 bis 100 erreicht. [Holmes et al. \(1994\)](#) nutzten eine Kopplung von zwei PCR-Reaktionen mit unterschiedlicher Spezifität für die Identifizierung von *C. albicans*.

Der Einsatz der PCR-Technik ist sinnvoll insbesondere für den Nachweis von schwer bzw. nicht anzüchtbaren oder sehr langsam wachsenden Erregern wie auch für den Nachweis von Erregern bei immunsupprimierten Patienten, bei denen konventionelle serologische Verfahren häufig versagen. Die bisher publizierten PCR-Methoden für den Direktnachweis von *Candida* spp. geben berechtigten Anlaß zu der Hoffnung, daß mit dem Nachweis einer geringen Anzahl von Erregern direkt in klinischen Materialien die Grenzen der bisher zur Verfügung stehenden kulturellen und serologischen Verfahren überwunden werden können. Vor einem Einsatz im mykologischen Routinelabor sind jedoch noch umfangreiche Optimierungen und Evaluierungen dieser Technologie erforderlich.

Die zur Zeit erreichten Sensitivitäten sind meist noch nicht zufriedenstellend. Durch die Auswahl einer geeigneten Zielsequenz, durch Optimierung der PCR-Bedingungen sowie durch verbesserte Techniken zur DNA-Extraktion aus klinischen Proben und zur spezifischen Detektion des amplifizierten Produkts sollten Nachweisgrenzen von unter 100 KBE/ml (möglichst 1-10 KBE/ml) erreicht werden. Umfassende klinische Testungen der PCR-Nachweise, die die Fragen nach der tatsächlichen Sensitivität und Spezifität der PCR im Routineeinsatz, auch im Vergleich mit den bisher etablierten Nachweisverfahren (Antigenserologie), nach der Bedeutung PCR-positiver und Kultur-negativer Ergebnisse, nach dem Einfluß abgestorbener Erreger oder persistierender Erreger-DNA

nach Chemotherapie usw. beantworten könnten, stehen noch aus. Bisher ist auch noch ungeklärt, ob mittels Quantifizierung der PCR-Ergebnisse zwischen einer Kolonisierung und einer invasiven Infektion unterschieden werden kann.

1.4 Verfahren zur Stammtypisierung bei *Candida*

Um Fragen nach der Infektionsquelle, der Übertragung, der Persistenz bzw. der Reinfektion bei *C. albicans*-Infektionen beantworten zu können, ist eine sichere und reproduzierbare Identifizierung der klinischen Isolate notwendig. Die ideale epidemiologische Typisierungsmethode ist einfach, schnell, sensitiv und hoch spezifisch (Pfaller et al. 1990). Außerdem wären standardisierte Methoden wünschenswert, um die Reproduzierbarkeit und den Vergleich der Ergebnisse zwischen den verschiedenen Laboratorien zu verbessern. Epidemiologische Studien an *Candida*-Infektionen sollten sowohl die Genotypen als auch die Phänotypen (Biotypen) von Stämmen aus klinischen Proben berücksichtigen, um die Stammidentität im Sinne der Infektkettenaufklärung nachweisen zu können.

Folgende Methoden wurden für die Charakterisierung und Feindifferenzierung von *Candida*-Stämmen entwickelt: Serotypie, Biotypie, Resistotypie, Typisierung der „Kilbertoxine“, Morphotypie, Bestimmung der Isoenzymmuster, DNA Restriktions Fragment Analyse mit Southernhybridisierung (DNA-Fingerprinting), Karyotypie (Pulsfeldgelelektrophorese), PCR-Techniken und Sequenzierung definierter DNA-Abschnitte.

Serologisch werden *C. albicans* nur in die 2 Serogruppen A und B unterteilt, die unterschiedlich hinsichtlich der Mannanstruktur sind (Hasenclever & Mitchell 1961, Tsuchiya et al. 1961) wobei große Unstimmigkeiten in den Ergebnissen bei der Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Serotypisierung festgestellt wurden. Diese Methode ist daher als epidemiologisches Werkzeug für die Typisierung von *C. albicans*-Stämmen ungeeignet (McCullough et al. 1996). Unabhängige Studien haben bestätigt, daß die meisten klinischen Isolate vom Serotyp A sind (Brawner et al. 1992, Martin & Lamb 1982, Auger et al. 1979). Stämme des Serotyp B scheinen eine Präferenz für den weibliche Genitaltrakt zu besitzen (Nobre 1996, Wade 1993) und zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber Flucytosin (Auger et al. 1979). Die beiden für *C. albicans* beschriebenen Serotypen A und B basieren auf Unterschieden der Oberflächenpolysaccharide (Hasenclever & Mitchell 1961, Tsuchiya et al. 1961).

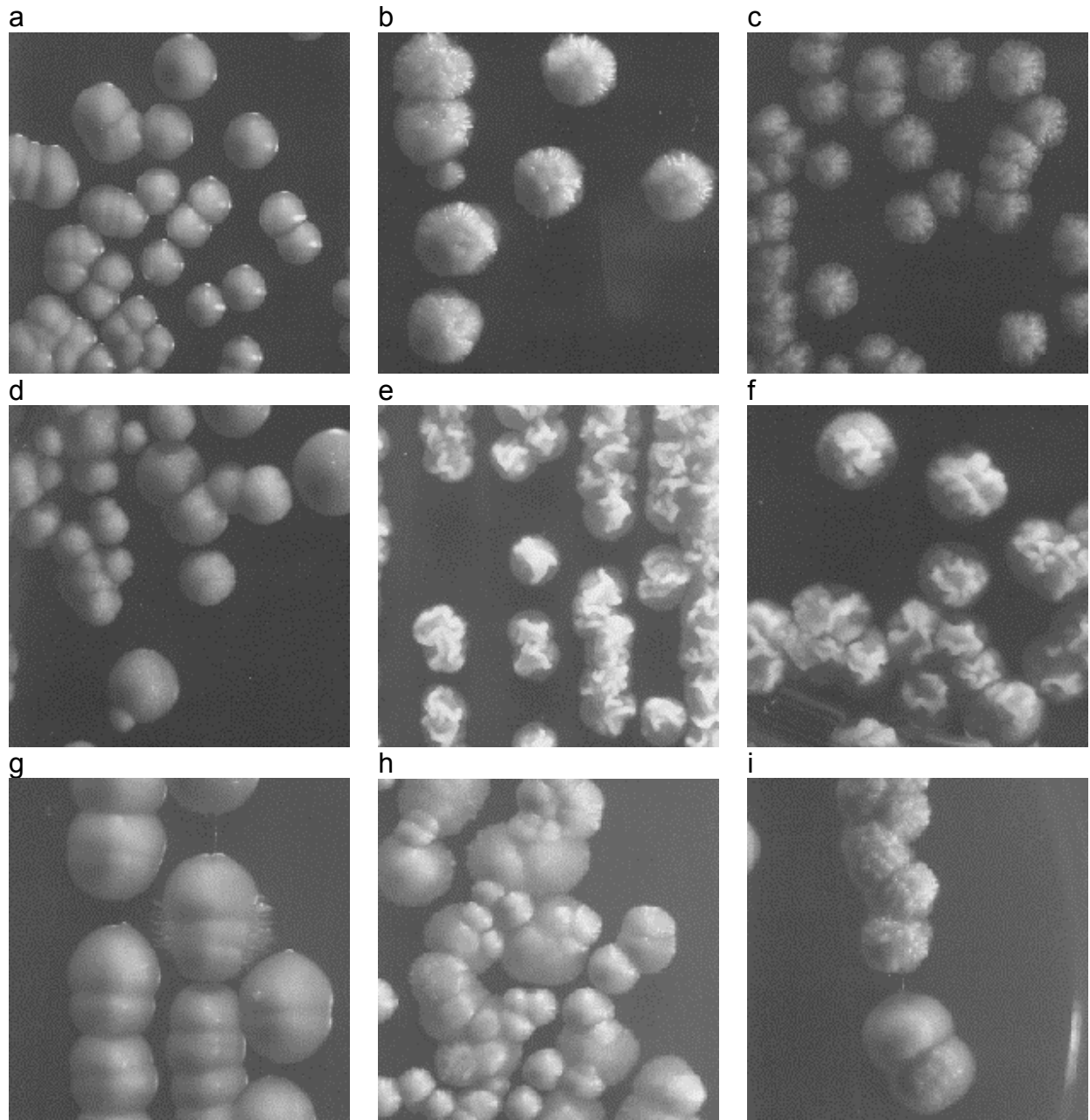
Das Biotypisierungssystem von [Odds und Abbott](#) (1980) benutzt eine Reihe von biochemischen Tests, welche die Identifizierung von über 500 potentiellen Biotypen von *C. albicans* und anderen *Candida*-Spezies ermöglicht. Die von [Williamson 1986](#) vorgeschlagene modifizierte Biotypisierung verwendete drei Tests, die API-ZYM- und API 20C-Systeme und einen Platten-Test zur Resistenztestung gegen Borsäure. [Pfaller](#) (1990) hat eine andere modifizierte Version verwendet, welche eine Reihe von insgesamt neun Testagarplatten benutzt: Wachstum bei pH 1,4, Proteinasebildung, 5-Fluorcytosin-Resistenz, Harnstoff-Assimilation, Sorbose-Assimilation, Salz-Toleranz, Zitrat-Assimilation, Resistenz gegen Natrium-Selenit und Resistenz gegen Borsäure. Diese 9 Reaktionen werden in Gruppen zu je 3 aufgeteilt und somit ergibt sich ein dreistelliger Code, der den Biotyp darstellt. Auf dem gleichen Prinzip basiert auch die Auswertung bei den Api-Systemen. Das Hauptproblem dieses Verfahrens (Biotypisierungssystem von Odds und Abbott) lag darin, daß eine große Anzahl von nicht verwandten Stämmen identische Biotypen hatten. Die Übereinstimmung der Daten zwischen verschiedenen Laboratorien war jedoch nicht zufriedenstellend, so daß die Methode, von einer idealen epidemiologischen Typisierungsmethode weit entfernt, nur für Forschungszwecke und nicht für Routinuntersuchungen empfohlen wird ([Odds et al. 1989](#)).

Das Resistogramm von Warnock und Mitarbeitern basiert auf den Unterschieden in den Resistenzen gegenüber 5 ausgewählten Substanzen in 4 verschiedenen Konzentrationen und erlaubt eine Diskriminierung von 32 potentiellen Resistotypen bei *C. albicans*. Das Resistogramm hat jedoch keine direkte Beziehung zum pathogenetischen Potential der getesteten Stämme ([McCullough et al. 1996](#)).

[Polonelli](#) und Mitarbeiter (1983) haben Killerfaktoren für die Typisierung von *C. albicans*-Isolaten benutzt. Killerfaktoren sind extrazelluläre Toxine, die von Hefen produziert werden, um andere Hefen innerhalb der gleichen Gattung bzw. von anderen Gattungen abzutöten, die diese Substanz selbst nicht produzieren. Trotz vielversprechender erster Ergebnisse, hat sich diese Methode für epidemiologische Zwecke nicht durchgesetzt.

Die Morphotypisierung nach Hunter, Mackenzie und Fraser ([Hunter et al. 1989](#)) ist eine Differenzierungsmethode, die auf Unterschieden in der Form und Ausdehnung des Marginalrandes der auf Malz nach über 10tägiger Bebrütung gewachsenen Kolonien beruht (s. Abbildung 1). Die Autoren vermuteten einen Zusammenhang zwischen der Virulenz und dem Morphotyp der Stämme bei *C. albicans*.

Abbildung 1: Beispiele für Morphotypen von *Candida albicans*. Quelle: WWW-Server für *C. albicans* [160].



Morphotypen und Form

- | | |
|-------------------------|------------------|
| a: Originalstamm, glatt | f: cerebritiform |
| b: rauh | g: glatt |
| c: rauh | h: rauh |
| d: glatt | i: rauh |
| e: cerebritiform | j: rauh |

Die Bestimmung der Isoenzymmuster basiert auf der Annahme, daß sie Veränderungen in den Genen, die diese Enzyme kodieren, widerspiegeln. Probleme entstehen dadurch, daß häufig mehr als ein Gen involviert ist und die molekulare Basis eines veränderten Profils meist unerkant bleibt. In den meisten Fällen liegt den Isoenzymprofilen eher eine Gruppe verwandter Genotypen als ein unikaler Genotyp zugrunde, so daß diese Methode nur begrenzte Aussagen zur Identität von Stämmen gestattet. Außerdem sind die Isoenzymmuster durch Umweltfaktoren, wie z.B. veränderte Kulturbedingungen, beeinflussbar ([Tibayrenc 1995](#)).

Neuere DNA-Typisierungsmethoden für die Untersuchung von Stammvariationen bei *Candida*-Spezies sind vielversprechender als die bisher diskutierten phänotypischen Verfahren. [Scherer & Stevens](#) führten als erste die Analyse von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) für die Charakterisierung von *C. albicans*-Stämmen durch. Die genomische DNA der Hefen wurde mit Restriktionsendonukleasen gespalten und die erhaltenen DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt (1987). Innerhalb der Restriktionsmuster wurden 4 starke Banden, identifiziert. 3 davon, die vermutlich die ribosomalen DNA-Regionen repräsentierten, waren in allen Isolaten vorhanden. RFLPs in der rDNA von *C. albicans* haben sich als nützliches Kriterium für die Differenzierung verschiedener Isolaten erwiesen ([Magee et al. 1987](#)). Die RFLP-Analyse benötigt relativ große DNA-Mengen und ist erst nach Hybridisierung mit spezifischen moderat repetitiven Sonden, wie z.B. der Ca3- und der 27A-Sonden ([Sadhu et al. 1991](#), [Scherer & Stevens 1988](#)) oder mit „simple repeat“-Sonden wie (GGAT)₄ oder (GTG)₅ ([Sullivan et al. 1993](#)) gut auswertbar. Das DNA-Fingerprinting mit der für *C. albicans* spezifischen Ca3-Sonde, das in zahlreichen epidemiologischen Studien angewendet wurde ([Soll 1996](#), [Schmid et al. 1995](#)), hat sich besonders bewährt für die Typisierung von klinischen *C. albicans*-Isolaten

Die Bestimmung des elektrophoretischen Karyotyps in der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wurde ebenfalls für Vergleiche klinischer Isolate von *C. albicans* benutzt. Bei dieser Methode werden die *Candida*-Chromosomen ihrer Größe nach aufgetrennt ([Merz et al. 1988](#)). Die Aussagefähigkeit der Karyotypie wird durch die Hybridisierung mit chromosomenspezifischen Sonden entscheidend verbessert, weil homologe Chromosomen unterschiedliche Größen aufweisen können ([Chu et al. 1993](#)). Insbesondere für das R-Chromosom wurde eine hohe Variabilität bei der Wanderung im Pulsfeldgel beschrieben, die zu einer im Vergleich zum benachbarten Chromosom 1 veränderten Po-

sition im Gel führen kann ([Magee et al. 1992](#), [Wickes et al. 1991](#)). Die RFLP-Analyse sowie, in noch stärkerem Ausmaß, die Karyotypie sind sehr zeit- und arbeitsaufwendig.

Reproduzierbare individuelle Muster von Amplifikationsprodukten, die eine Spezies- bzw. Subspeziesdifferenzierung erlauben, können bei verschiedenen Bakterien-, Pilz-, Pflanzen- und Tierarten durch die Nutzung einzelner Primer in der PCR erhalten werden. Bei der bisher am häufigsten angewendeten Technik, der „Random Amplified Polymorphic DNA“ (RAPD), werden kurze Zufallsprimer (10 mer) in der PCR zum Nachweis genetischer Unterschiede bei verschiedenen *C. albicans*-Stämmen benutzt ([Williams et al. 1990](#)). Bei der „Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction“ (AP-PCR) werden längere Zufallsprimer verwendet ([Welsh et al. 1990](#)). Andere Bezeichnungen für diese bzw. ähnliche Methoden sind „DNA Amplification Fingerprinting“ (DAF) oder PCR-Fingerprinting. Diese Verfahren sind sehr schnell durchführbar und ausreichend reproduzierbar. Verglichen mit der elektrophoretischen Karyotypisierung und RFLP-Analysen wurde bei Anwendung der RAPD-Technik für die Typisierung von *C. albicans*-Isolaten eine vergleichbare Diskriminierung beschrieben ([Bostock et al. 1993](#)).

Polymorphe DNA-Abschnitte bei Pilzen wurden sowohl mit der RAPD-Technik ([Bostock et al. 1993](#), [Niesters et al. 1993](#), [Lehmann et al. 1992](#)) als auch durch den Einsatz von Primern, die an Mini- oder Mikrosatelliten-DNA und andere repetitive Sequenzen anlagern, amplifiziert ([Thanos et al. 1996](#), [Lieckfeldt et al. 1993](#), [Meyer et al. 1993](#); [Niesters et al. 1993](#), [Schönian et al. 1993a](#)). Dieses PCR-Fingerprinting, bei dem Polymorphismen nachgewiesen werden, die zufällig über das gesamte Genom verteilt sind ([Welsh et al. 1992](#)), benötigt keine vorherige Sequenzinformation.

Das DNA-Fingerprinting hat auch Hinweise zur Unterstützung des Konzepts, daß nosokomiale Übertragungen stattfinden können geliefert. Allerdings konnte noch kein genetischer Typ oder eine Gruppe genetischer Typen in Zusammenhang zu der Virulenz gebracht werden ([Lunel et al. 1998](#), [McCullough et al. 1996](#), [Meusel 1996](#), [Schönian et al. 1993a - b](#)) und es gibt noch Unstimmigkeiten welche Methode für eine konkrete Untersuchung am besten geeignet ist. Weitere Untersuchungen mit den verschiedensten Methoden sollen dazu beitragen grundlegende Fragen zu der Epidemiologie von Pilzkrankheiten zu erklären. Es ist wünschenswert, wenn bestimmte Marker, sowohl phänotypisch als auch genetisch, gefunden und entschlüsselt werden könnten, welche routinemäßig mit dem Fortschreiten der Krankheit assoziiert sind und welche dem Kliniker bei der Behandlung der schlimmsten Formen dieser Infektion helfen werden.

1.5 Aufgabenstellung

Die Vertreter der Gattung *Candida* werden bisher auf der Basis ihrer Unterschiede in vielen phänotypischen Merkmalen, wie in der Koloniemorphologie, in der Bildung von Keimschläuchen, Hyphen und Chlamydosporen, in der Resistenz gegenüber Antimykotika, in den Wachstumscharakteristika sowie in der Antigen- und Enzymausstattung differenziert.

Molekulare Vergleiche haben gezeigt, daß viele dieser phänotypischen Merkmale zu unzuverlässlich sind, um die Definition und Erkennung der Spezies zu gewährleisten. In letzter Zeit wurden vermehrt *Candida*-Isolate mit atypischer Morphologie und Biochemotypie beschrieben, bei denen die phänotypischen Methoden für die Speziesidentifizierung falsche Ergebnisse lieferten oder völlig versagten. In diesen Fällen konnte eine exakte Diagnose erst mit Hilfe molekularbiologischer Methoden gestellt werden.

Ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, molekularbiologische Methoden für die Identifizierung konventionell schwer differenzierbarer *Candida*-Isolate einzusetzen.

Beispielsweise ist die Differenzierung zwischen den Spezies *C. guilliermondii* und *C. famata* sehr schwierig und gelingt nicht, wenn *C. guilliermondii* keine Pseudohyphen ausbildet. Im Gegensatz zu *C. famata* ist *C. guilliermondii* eine pathopotente und gegenüber vielen Antimykotika hochresistente *Candida*-Art, die besonders bei Diabetikern und Schwerverletzten häufig schwere Infektionen auslöst ([Tietz and Czaika 1999](#)). Für eine Unterscheidung dieser Erreger von der weitgehend identischen, weniger pathogenen Spezies *C. famata* sollten in dieser Arbeit zwei verschiedene PCR-Verfahren eingesetzt werden. Zum einen sollte die PCR-Fingerprint-Technik, bei der mit Hilfe unspezifischer Primer weitgehend speziesspezifische PCR-Produkte erhalten werden ([Thanos et al. 1996](#)) genutzt werden, zum anderen sollte bei den fraglichen Isolaten der "Internal Transcribed Spacer" (ITS) im ribosomalen Operon amplifiziert und anschließend mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen gespalten werden. Mit beiden Techniken war die Speziesidentifizierung bei unterschiedlichen Patientenisolaten beabsichtigt.

Die PCR-Fingerprint-Technik sollte auch für die Charakterisierung vermutlicher *C. albicans*-Stämme genutzt werden, bei denen die konventionelle Diagnostik auf Grund atypischer morphologischer und biochemischer Eigenschaften fraglich war.

Genotypische und phänotypische Analysen haben ein hohes Maß an Variabilität innerhalb der Art *Candida albicans* gezeigt. Wenig ist jedoch bisher über den Grad der Variabilität innerhalb der Spezies, über eine eventuell unterschiedliche geographische Verteilung bestimmter Isolate und über die Beziehungen zur Fähigkeit der Organismen, eine bestimmte Körperregion zu kolonisieren oder zu infizieren, bekannt.

Eine weitere Zielstellung in der vorliegenden Arbeit war deshalb eine vergleichende phänotypische und genotypische Charakterisierung von *C. albicans*-Vaginalisolaten aus Europa und Afrika. Dafür sollten einerseits die Biotypen mit dem Api 32C-System und andererseits die Genotypen mit der PCR-Fingerprint-Technik bestimmt werden. Wird die genomische DNA von *Candida* spp. mit unspezifischen Primern amplifiziert, erhält man neben speziesspezifischen auch eine Reihe von stammspezifischen PCR-Produkten. Auf der Basis der so erhaltenen PCR-Profile sollten die Genotypen der europäischen und afrikanischen *Candida albicans*-Isolate verglichen und die genetischen Distanzen ermittelt werden.

Epidemiologische Untersuchungen erfordern vor allem eine Klärung des Übertragungsmodus und -weges der Erreger und setzen Methoden voraus, die in der Lage sind Stammunterschiede aufzudecken. In früheren Arbeiten unserer Gruppe konnte bereits gezeigt werden, daß das PCR-Fingerprinting gut für Stammtypisierungen im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen bei *C. albicans* geeignet ist ([Schönian et al. 1993a](#), [Thanos et al. 1996](#)). In der vorliegenden Arbeit war beabsichtigt diese Methode für einen Vergleich der *Candida*-Stämme von aus verschiedenen Körperregionen bei Frauen mit Vaginalcandidose und deren Partnern einzusetzen. Außerdem sollte geklärt werden, ob wiederholte Episoden der Candidose durch den gleichen Stamm oder durch unterschiedliche Stämme hervorgerufen werden.

Im Ergebnis dieser Studie werden Aussagen dazu erwartet, ob molekularbiologische Methoden eine sinnvolle Ergänzung der konventionellen mykologischen Diagnostik bei Problemfällen und bei epidemiologischen Studien darstellen können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Stämme

Tabelle 6: Herkunft der klinischen Stämme

Herkunft	Stämme	Anzahl	Material
Angola	<i>C. albicans</i>	49	Vaginalabstrich
	<i>C. albicans</i> (atypische Stämme)	8	Vaginalabstrich
Madagaskar	<i>C. albicans</i> (atypische Stämme)	14	Vaginalabstrich
Portugal	<i>C. albicans</i>	49	Vaginalabstrich
Berlin	<i>C. albicans</i>	47	Vaginalabstrich
	<i>C. famata</i> / <i>C. guilliermondii</i>	37	Vaginalabstrich / Haut
München	<i>C. albicans</i>	45	Vaginalabstrich
Frankfurt Oder	<i>C. albicans</i>	74	Vaginalabstrich
Prof. Korting	<i>C. albicans</i> (atypische Stämme)	4	Vaginalabstrich
Prof. Hantschke	<i>C. albicans</i> (atypische Stämme)	5	Vaginalabstrich

Die angolanischen Stämme wurden in der Hauptstadt Luanda von ambulanten Patientinnen isoliert, die die Klinik entweder zur Kontrolle vor/oder nach Einführung eines Intrauterinpessars oder wegen des Verdachts auf Vaginitis aufgesucht hatten. Alle auf Saboraud-Agar gewachsenen Hefen wurden ohne weitere Diskriminierung gesammelt, die Speziesidentifizierung wurde dann in Deutschland durchgeführt. Bei den Patientinnen, die zwischen 17 und 45 Jahre alt waren, handelte es sich ausschließlich um afrikanische Frauen, bei denen jedoch Kontakte zu Ein- und Auswanderern nicht ausgeschlossen werden konnten.

Die Stämme aus Madagaskar wurden im Rahmen einer Erhebung über das Vorkommen sexuell übertragbaren Krankheiten bei Prostituierten von Kollegen des Landestropeninstituts gesammelt.

Die klinischen Stämmen aus Portugal stammten sowohl von ambulanten als auch von stationär aufgenommenen Patientinnen aus zwei großen Zentren in Lissabon. Dabei handelte es sich um Frauen unterschiedlicher Herkunft (Europäerinnen, afrikanische Einwanderinnen) und unterschiedlicher sozialer Schichten. Die Stämme wurden uns freundlicherweise von Frau Dr. Laura Rosado, Frau Dr. Isabel Costa und Herrn Prof. Dr. Mia Cabaço übergeben.

Vaginalisolate, die in Berlin, in Frankfurt/Oder und München gesammelt wurden, wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Tietz, Herrn P.D. Dr. med. W. Mendling, Herrn Prof. Dr. med. D. Hantschke und von Herrn Prof. Dr. med. H. C. Korting zur Verfügung gestellt.

Zu den mit konventionellen Methoden schwer identifizierbaren *Candida*-Isolaten gehörten *C. famata* / *C. guilliermondii*-Isolate aus Berlin sowie *Candida*-Isolate mit atypischen morphologischen und biochemischen Eigenschaften aus Angola und Madagaskar sowie aus verschiedenen Städten Deutschlands, die wir von Prof. Dr. med. Tietz, von Prof. Dr. med. Korting und Prof. Dr. med. Hantschke erhielten.

Aus Frankfurt/Oder erhielten wir *Candida*-Isolate, die von verschiedenen Lokalisationen bei Frauen mit Vaginalcandidose und deren Partnern isoliert wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende *Candida*-Referenzstämme verwendet (Tabelle 7), erhielten von dem Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande und von der American Type Cultures Collection.

Tabelle 7: Referenzstämme

CBS 562	<i>C. albicans</i> Serotyp A	CBS 1795	<i>C. famata</i>
CBS 5983	<i>C. albicans</i> Serotyp B	ATCC 6260	<i>C. guilliermondii</i>
CBS 1905	<i>C. stellatoidea</i>	NCYC 350	<i>C. glabrata</i>
CBS 159	<i>C. sake</i>	CBS 4413	<i>C. lusitaniae</i>

2.1.2 Primer

Tabelle 8: Verwendete Primer. Hersteller: TIB MOLBIOL, Berlin

Primer	Sequenz
T3B (McClelland et al. 1992)	5` AGG TCG CGG GTT CGA ATC C 3`
M13core (Huey & Hall 1989)	5` GAG GGT GGC GGT TCT 3`
AP3 (Williams et al. 1990)	5` TCA CGA TGC A 3`
LR1 (White et al. 1990, / Vilgalys et al. 1990)	5` GGT TGG TTT CTT TTC CT 3`
SR6S (White et al. 1990, / Vilgalys et al. 1990)	5` AAG TAA AAG TCG TAA CAA GG 3`

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung

Die klinischen Pilzisolat wurden in verschiedenen Kliniken mit den üblichen Methoden gesammelt:

Vaginalabstriche wurden mit sterilem Abstrichtupfer von der Vaginalwand entnommen und entweder sofort auf die entsprechenden Nährmedien überimpft, wenn die Probengewinnung im Labor stattfand, oder in Transportmedium gegeben, wenn die Proben auf den Stationen entnommen wurden.

Die Hautproben wurden fast alle im Labor entweder mit Skalpell oder mit Abstrichtupfer, gewonnen und direkt überimpft. Bei allen Hautproben wurde das Material für mikroskopische und kulturelle Untersuchungen geteilt.

2.2.2 Identifizierung mit konventionellen Methoden

2.2.2.1 Kulturelle Verfahren

Für die Primärkulturen wurden die Patientenmaterialien direkt auf Sabouraud-Dextrose-Agar überimpft. Die Ablesung der Platten erfolgte nach Bebrütung von bis zu 10 Tagen jeweils bei Raumtemperatur, 30° C und 37° C. Alle unterschiedlich aussehenden Hefekolonien wurden weiter bearbeitet. Die Aufbewahrung der Hefekulturen erfolgte auf Sabouraud-Schrägagar bei Raumtemperatur. Regelmäßige Überimpfungen auf frische Nährmedien wurden in Abständen von 3 bis 4 Monaten durchgeführt. Für längere Aufbewahrungszeiten wurden die Hefen lyophilisiert bzw. in destilliertem Wasser konserviert ([Rodrigues 1992](#), [Odds 1991](#)).

2.2.2.2 Mikroskopie

Für den Nachweis von Chlamydosporen bzw. Pseudohyphen wurden die *Candida*-Isolate auf Reisextrakt-Agar angezüchtet. Die Platten wurden normalerweise 2 bis 3 Tage, in Zweifelsfällen bis zu 10 Tagen, bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bewertung der Mikromorphologie erfolgte mittels Lichtmikroskop. Die Beobachtung erfolgte mit ei-

nem Spezialobjektiv mit 32facher Vergrößerung.

Bei Anzucht auf ALBICANS ID-Agar wachsen *C. albicans*, *C. stellatoidea* und *C. dubliniensis* als blaue Kolonien, während alle anderen Kolonien keine Farbänderung zeigen. Die Bebrütung erfolgte über 24 Stunden, bei langsamwachsenden Hefen bis zu 10 Tagen, im Brutschrank bei 30 °C.

2.2.2.3 Biochemische Differenzierung

Alle in dieser Arbeit untersuchten *Candida*-Isolate wurden durch Anzucht auf ALBICANS ID-Agar bzw. Reisagar sowie durch Biochemotypie mit dem Api ID 32 C-System konventionell identifiziert.

Weiterhin wurde das Api Zym-System getestet als zusätzliche Identifizierungsverfahren für ausgewählte *Candida*-Spezies. Mit diesem System können 19 verschiedene Enzymaktivitäten direkt nachgewiesen werden. Dabei wurden die entsprechenden Teststreifen nach den Vorschriften des Herstellers beimpft, bebrütet und abgelesen.

2.2.2.3.1 API-System

Das Api-System ist eine biochemische Reihe, mit der Mikroorganismen anhand von standardisierten und miniaturisierten Assimilations- und Fermentationsreaktionen identifiziert werden können. Für die Differenzierung von Hefen können die Systeme Api Auxacolor, Api 20 C und Api 32 C verwendet werden. Mit dem Auxonogramm werden die Hefearten über ein Schlüsselsystem bestimmt. Das Api-System 32 C benutzt 32 biochemische Reaktionen, die in Dreiergruppen eingeteilt werden. Jede positive Reaktion erhält den Wert 1, 2 oder 4, je nach Position innerhalb der Gruppe (erster, zweiter oder dritter Test). Die Addition der drei Werte (0 für negative Reaktionen) ergibt für jede Gruppe einen Wert zwischen 0 und 7. Die ersten 24 Tests ergeben einen achtstelligen Code. Die 8 anderen Reaktionen sind Zusatzreaktionen, die bei niedriger Selektivität zur weiteren Differenzierung verwendet werden, sowie eine Negativkontrolle als Referenz für die Ablesung der Assimilationsreaktionen. Das erhaltene Profil kann sowohl manuell als auch automatisch mit den im „Analytischen Profil Index“ enthaltenen Profilen verglichen werden. Für die Identifizierung gibt es fünf verschiedene Möglichkeiten:

1. Identifizierung eines Taxons: ein Taxon (Speziesgruppe) erscheint z.B. *Candida albicans*.
2. Identifizierung einer Spezies: 2, 3 oder 4 Taxa (Biotypen) der gleichen Spezies erscheinen. Ein Biotyp ist eine Untergruppe von Hefen innerhalb einer Spezies, welche im ID 32 C System dieselben biochemischen Reaktionen zeigen z.B. *Candida albicans* 1.
3. Identifizierung auf Genusebene: 2, 3 oder 4 Taxa des gleichen Genus erscheinen.
4. Niedere Selektivität: 2, 3 oder 4 Taxa verschiedener Genera erscheinen.
5. Das Profil ist nicht im Index. Dies ist möglich, wenn das Profil sehr atypisch oder sehr selten ist.

Alle Stämme wurden mit dem Api ID 32 C-System biochemisch differenziert. Dafür wurden die Streifen nach den Vorschriften des Herstellers beimpft und bis zu zwei Tagen bei 30 °C oder für langsamwachsende Hefen bis zu 7 Tagen bei Raumtemperatur bebrütet. Die Auswertung erfolgte nach 24, 48 und 72 Stunden sowohl manuell unter Verwendung des entsprechenden Profilindex bzw. über eine Prozenttabelle als auch automatisch mit dem ATB-Lesegerät und der entsprechenden Software. Zur Unterscheidung ähnlicher Profile wurde auch die Morphologie auf Reisagar hinzugezogen.

2.2.3 Identifizierung mit molekularbiologischen Methoden

2.2.3.1 DNA-Präparation

Die Isolierung der gesamten DNA erfolgte mit einer modifizierten Methode nach [Monique Gardes \(1993\)](#).

3-5 Hefekolonien wurden mit 500 µl 2% CTAB-Puffer in Eppendorf-Tubes suspendiert. Der Zellaufschluß wurde durch 3x Frieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 65° C erreicht. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 65 °C für 30-60'.

Dann wurde die Lösung mit 1 Vol. Chloroform versetzt, leicht geschüttelt und 15 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, erneut 1 Vol. Chloroform zugesetzt und zentrifugiert. Diese Prozedur wurde mindestens 3 Mal wiederholt bis keine Interphase mehr sichtbar war und der Überstand möglichst farblos war.

Zur Fällung der DNA wurden dem Überstand 600 µl eiskaltes Isopropanol zugegeben,

die DNA-Lösung bei -20 °C für über 1 h aufbewahrt und 10 min bei 13.000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Sediment mit 70%-igen kaltem Äthanol gewaschen und anschließend in einer Speed-Vac bei 6.000 x g vakuumgetrocknet.

Das DNA- Pellet wurde je nach Menge in ca. 100-200 µl TE-Puffer über Nacht bei Raumtemperatur gelöst und bis zum weiteren Gebrauch bei -20° C gelagert.

2.2.3.2 DNA-Konzentrationsbestimmung und Lagerung der DNA-Proben

Ein Aliquot der zu messenden DNA-Lösung wurde mit Aqua bidest. oder TE-Puffer 1:20 bis 1:200 verdünnt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch (Quarzküvette, 1 cm Schichtdicke) durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Extinktion von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml ([Sambrook et al. 1989](#)).

Um den Reinheitsgrad der DNA-Lösung zu ermitteln, wurde der Quotient der Extinktionen bei OD260/OD280 bestimmt. Der errechnete Wert sollte für eine reine DNA-Präparation, bei 1,8 - 2,0 liegen. Liegt der Wert darunter, so weist dies auf eine Kontamination der Probe durch Proteine oder Phenol hin, während ein Quotient > 2 für eine Verunreinigung durch RNA spricht.

Die konzentrierten DNA-Lösungen wurden bei -20° C aufbewahrt.

Die Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 10 ng/µl wurden mit Aqua bidest. oder TE-Puffer hergestellt und bei 8° C gelagert.

2.2.3.3 PCR-Fingerprinting (Polymerasekettenreaktion)

Bei den PCR-Fingerprinting-Reaktionen wurden 50 µl PCR-Ansätze verwendet, die wie folgt zusammengesetzt waren:

Tabelle 9: PCR-Ansätze

Reagenz	Menge
Reaktionspuffer	5 µl
Primer	25 pmol
Taq-DNA-Polymerase	3 U
dNTP's	jeweils 200 mM
DNA	25 ng
Wasser	Füllung auf 50 µl
Mineralöl	1 Tropfen

Folgende PCR-Parameter wurden benutzt:

Tabelle 10: PCR-Programme für das DNA-Fingerprint

Primer	T3B	M13c	AP3c
Initiale Denaturierung	2 min bei 95 °C	2 min bei 95 °C	2 min bei 95 °C
Denaturierung*	20 sec bei 95 °C	20 sec bei 95 °C	1 min bei 95 °C
Annealing *	30 sec bei 52 °C	60 sec bei 50 °C	30 sec bei 36 °C
Primer-Extinction*	1' 20" bei 72 °C	20" bei 72 °C	2 min bei 72 °C
*Anzahl Zyklen	32	27	45
Inkubation	6 min bei 72 °C	6 min bei 72 °C	6 min bei 72 °C
Abkühlung	4 °C	4 °C	4 °C

Anschließend wurden die PCR-Produkte in der Speed Vac. auf 20 µl eingengt und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.3.4 Amplifizierung und Restriktionsanalyse der ITS-Region

2.2.3.4.1 PCR zur Amplifizierung der ITS-Region

Die PCR zur Amplifizierung der gesamten ITS-Region wurde unter Verwendung der [LR1- und SR6S-Primer](#) (Seite 28) nach dem Ansatz wie in [Tabelle 11](#) durchgeführt.

Der PCR-Ansatz wurde gemischt, mit 1 Tropfen PCR-Mineralöl überschichtet, und für 5 Sekunden zentrifugiert. Zur Initialdenaturierung der DNA wurde der Ansatz für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, und das Zyklerprogramm gestartet. Ein Zyklus bestand aus folgenden 3 Schritten ([Tabelle 12](#)):

Tabelle 11: PCR Ansatz zur Amplifizierung der gesamten ITS-Region

Menge	Reagent
5 µl	Templat-DNA (= 50 ng)
5 µl	10X PCR-Puffer
4 µl	1,25 mM dNTPs (Endkonzentration je Nukleotid 200 µM)
1,5 µl	Primer-Lösung I (= 15 pmol)
1,5 µl	Primer-Lösung II (= 15 pmol)
0,4 µl	Taq-Polymerase (4 Units)
Mit Aqua bidest. auf 50 µl auffüllen	

Tabelle 12: Zyklerprogramm der PCR zur Amplifizierung der gesamten ITS-Region

Schritt	Dauer
1. Denaturierung	1 min bei 95°C
2. Primer-Bindung	30 sec bei 54°C
3. Primer-Extension	1' 20" bei 72 °C

Der Zyklus wurde 34 mal wiederholt. An den letzten Zyklus schloß sich eine 6-minütige Inkubation bei 72 °C und eine Abkühlung bis auf 4° C an.

2.2.3.4.2 Restriktionsanalyse der ITS-Region

- Prinzip:
- Amplifizierung der ITS-Region einschließlich Elektrophorese
 - Spaltung der amplifizierten ITS-Region mit Restriktionsenzymen einschließlich Elektrophorese
 - Fotografie
 - Auswertung
- Schritte:
- Die Verfahren zur Amplifizierung der ITS-Region sind bereits in der [Tabelle 11](#) und [Tabelle 12](#) erwähnt.
 - Die enzymatische Spaltung der amplifizierten ITS-Region erfolgte wie in der [Tabelle 13](#) dargestellt.

Tabelle 13: Ansatz zur enzymatischen Spaltung der amplifizierten ITS-Region mit den Restriktionsenzymen Hae III und Dde I

Reagenz	Menge
PCR-Produkte	10,0 µl
Puffer	1,5 µl
H ₂ O	2,5 µl
Enzym	je 1,0 µl (10 units)
Inkubation	37° C x 2 Std. Brutschrank

2.2.3.5 Nachweis der PCR-Produkte

2.2.3.5.1 Elektrophorese für das Fingerprinting

Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurde 1,2%-iges Agarosegel (0,5 x 25 x 20 cm) verwendet. Die Agarose wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle in 1 X TBE-Puffer vollständig gelöst und nach leichter Abkühlung in eine Gelschale gegossen.

Als Laufpuffer wurde 0,5 X TBE-Puffer verwendet. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 1/8 Volumen [Stoplösung](#) (Seite 40) versetzt und aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde die 1 kb Leiter, benutzt.

Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte bei konstanter Spannung von 100 Volt für 5 h.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 5-10 Minuten in einem Ethidiumbromidbad gefärbt. Zur Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz durch freies Ethidiumbromid und zur besseren Analyse komplexer DNA-Bandenmuster wurde das Gel in Wasser entfärbt. Danach, wurde das Gel noch einmal 15 min bei 125 V laufen gelassen, um schärfere Banden zu erhalten.

2.2.3.5.2 Elektrophorese des ITS-PCR-Produkts und des Restriktionsfragments

Für den Nachweis der PCR-Produkte nach Amplifikation der ITS-Region wurde 1,3%-iges MetaPhor-Agarosegel. (12 x 13 x 0,5 cm) verwendet und als Molekulargewichtsmarker die 100 bp Leiter benutzt.

Zunächst wurden die DNA-Fragmente bei konstanter Spannung 80 Volt, für 3 h separiert.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 5-10 Minuten in einem Ethidiumbromidbad gefärbt. Zur Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz durch freies Ethidiumbromid wurde das Gel in Wasser entfärbt und noch mal 15' bei 100 V laufen gelassen.

2.2.3.5.3 Fotografie

Nach den Elektrophoresen wurden die Banden auf den Gelen unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 305 nm sichtbar gemacht und mit einer "Polaroid MP-4-Land Camera" Sofortbild Kamera mit Polaroid Instant Film #667 oder #100 fotografiert.

2.2.3.6 Computergestützte Analyse der PCR-Fingerprints

Zur Auswertung der Fingerprint-Muster wurde zunächst mit Hilfe einer scannerverbundenen Hard- und Software für den Computer (RFLPscan, Version 2.01, Scanalytics, CSP Inc., Billerica, USA) das Molekulargewicht jeder auftretenden Bande bestimmt. Es wurde dann eine binäre Datenmatrix für jeden der untersuchten *C. albicans*-Stämme erstellt. Banden, die im jeweiligen Stamm vorhanden waren, wurden mit 1 und fehlende Banden mit 0 kodiert.

Zur Ermittlung der genetischen Verwandtschaft der *C. albicans*-Vaginalstämme verschiedener geographischer Herkunft wurde eine phylogenetische Analyse mit Hilfe der UPGMA-Methode (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) durchgeführt

(Sneath & Sokal 1973). Zunächst wurde die evolutionäre Distanz zwischen den unterschiedlichen PCR-Fingerprint-Mustern mit der Methode von Nei und Li (1979) ermittelt. Anschließend wurde die erhaltene Distanzmatrix für die Konstruktion eines Dendrogramms verwendet. In dieser Arbeit wurde dafür die Treecon-Software (Van De Peer 1994) genutzt. Die statistische Signifikanz der einzelnen Verzweigungen im Dendrogramm wurde durch eine Bootstrap-Analyse mit 100 Replikationen überprüft. Erst bei Werten über 90% kann die jeweilige Topologie als gesichert angesehen werden (Swofford und Olsen 1990).

2.2.3.7 Computergestützte Auswertung der ITS-RFLP-Analysen

Für die Bestimmung der Molekulargewichte der Restriktionsfragmente wurde die gleiche scannergestützte Hard- und Software für den Computer wie für das PCR-Fingerprinting verwendet.

2.2.4 Chemikalien, Enzyme, Lösungen, Geräte

Tabelle 14: Verwendete Chemikalien:

Produkte	Hersteller
Agarose MetaPhor	Biozym, Oldenburg
Agarose NA	Pharmacia Biotech, Freiburg
Ampli Taq® DNA Polymerase	Perkin Elmer, Überlingen
Desoxynukleosidtriphosphate-set (dNTPs)	Pharmacia / LKB, Freiburg
DNA-Leiter 1 Kb	GibcoBRL, Eggenstein:
DNA-Leiter 123 bp	GibcoBRL, Eggenstein:
Hexadecetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Ferak, Berlin:
Mercaptoethanol	Ferak, Berlin:
Mineral Öl	Sigma, St. Louis, Mo. USA
Sabouraud-Dextrose-Agar	Difco Laboratories
Kimmig-Agar	Merck KGaA, Darmstadt
Reisextrakt-Agar	Merck KGaA, Darmstadt
ALBICANS ID-Agar	bioMérieux sa
Api ID 32 C	bioMérieux sa
Api Zym	bioMérieux sa
Hae III-Restriktionsendonuklease	Boehringer, Mannheim
Dde I-Restriktionsendonuklease	Boehringer, Mannheim

Tabelle 15: Verwendete Geräte:

Produkte	Hersteller
Eagle Eye II	Startagene, Heidelberg
Kamera MP-4 Land Camera	Polaroid, USA
Polaroid Films Prolapan P100, P667	Kodak, Stuttgart
667 und 100-Positivfilm	Kodak, Stuttgart
Spektrophotometer Ultrospec III	Pharmacia / LKB, Freiburg
Speed Vac SVC100E	Savant Instruments, Farmingdale, NY
Thermozykler Trioblock	Biometra-Hybaid, Göttingen
Thermozykler Perkin-Elmer 9600	Perkin-Elmer Corp. Emeryville, California
UV-Transilluminator	UVP, San Gabriel, USA
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
ATB-Lesegerät	bioMérieux sa, Marcy-l'Etoile, Frankreich

2.2.5 Rezepte

CTAB-Puffer:

100 mM Tris-Hcl pH 8,0
20 mM EDTA
1,4 M NaCl
2% CTAB
0,2% Mercaptoethanol
auf 100 ml mit bidest. auffüllen

TE-Puffer

10 mM Tris.Cl (pH 8,0)
1 mM EDTA (pH 8,0)

10 x TBE-Puffer:

107,8 g Tris-Base

55,0 g Borsäure

20 mM EDTA

auf 1000 ml mit Aqua bidest auffüllen

pH 7,5 mit Phosphorsäure einstellen

Stopplösung

0,5 ml Formamid

0,4 ml 0,5M EDTA (pH 8,0)

5 mg Bromphenolblau

5 mg Xylencyanol FF

0,1 ml Aqua bidest.

Komponenten für die PCR-Ansätze:

DNA 25 ng

Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0]; 50 mM KCl;
1.5 mM MgCl₂: 3 mM MgAc)

dNTP's dATP, dCTP, dGTP und dTTP

3 ERGEBNISSE

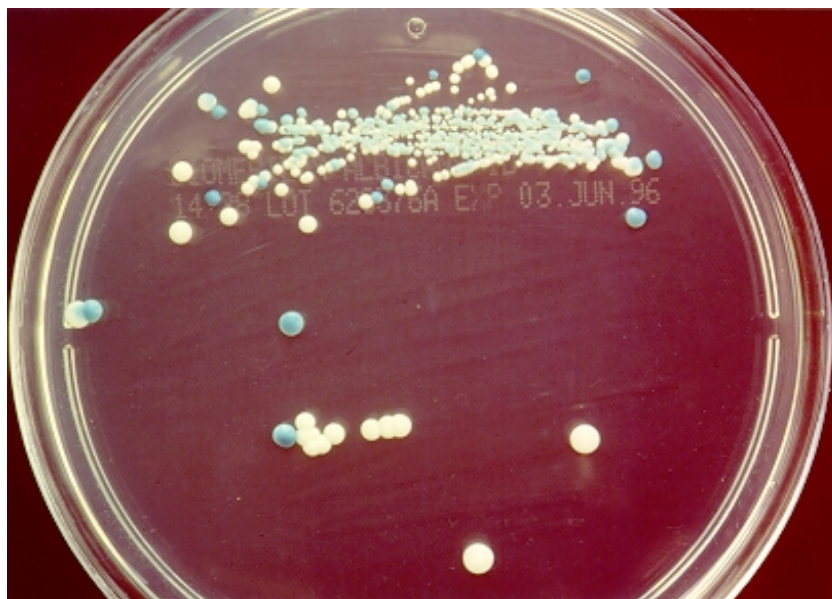
3.1 Methoden zur konventionellen Identifizierung der *Candida*-Isolate

Für die Identifizierung der *Candida*-Isolate wurden folgende konventionelle Techniken getestet:

- Anzucht auf dem Differentialnährboden ALBICANS ID-Agar®
- Bildung von Chlamydosporen, Pseudohyphen und echten Hyphen nach Anzucht auf Reisagar
- Prüfung der Stoffwechselleistungen mit den Systemen API 32C und API-zym

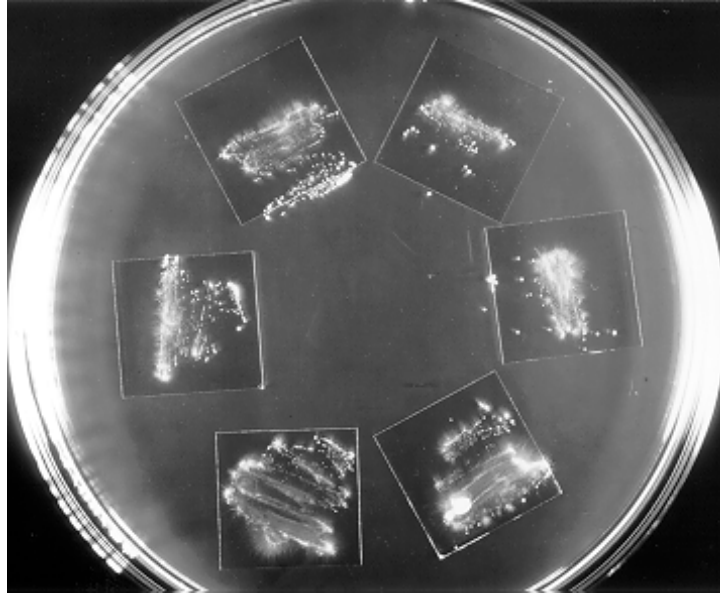
Der Differentialnährboden ALBICANS ID-Agar® enthält ein chromogenes Substrat, welches durch das für *C. albicans* und die eng verwandten Spezies *C. stellatoidea* und *C. dubliniensis* spezifische Enzym Hexosaminidase gespalten wird. Kolonien dieser Spezies erscheinen deshalb auf Differentialnährboden blau- bis hellgrün gefärbt, während alle anderen Kolonien weiß bzw. andersfarbig aussehen. Mit dieser Methode können daher *C. albicans*-Isolate einfach und sicher von anderen *Candida*-Arten, mit Ausnahme von *C. dubliniensis*, unterschieden werden ([Abbildung 2](#)).

Abbildung 2: *Candida albicans* und non-*albicans* Arten auf dem Nährboden ALBICANS ID-Agar®



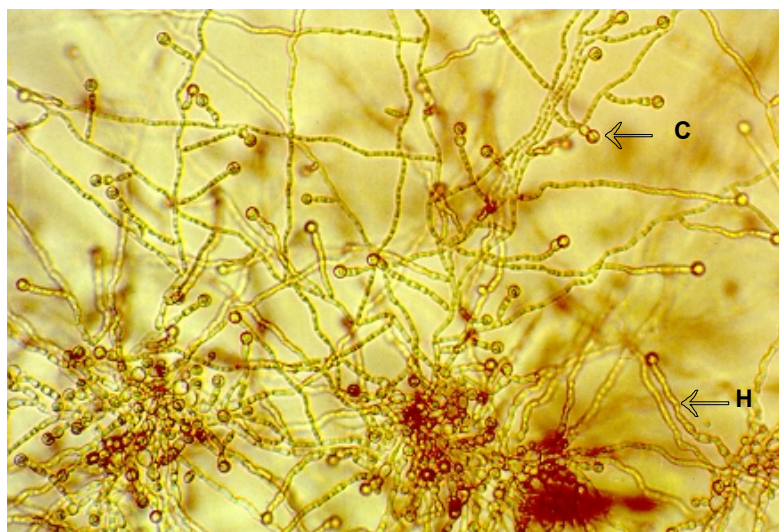
Bei einem Wachstum von *Candida* auf Reisagar wird ein halbaerobes Milieu erzeugt, wodurch es zur Bildung von Hyphen und Chlamydosporen kommt ([Abbildung 3](#) und [Abbildung 4](#)).

Abbildung 3: Mit *Candida* Arten beimpfte Reisagar-Platte



Alle auf dem Differentialnährboden ALBICANS ID-Agar® gewachsenen Kolonien wurden nach 2 bis maximal 10tägiger Bebrütung auf Reisextrakt-Agar mikroskopisch untersucht. Bei den meisten der blaugrün gefärbten *C. albicans* wurden die erwarteten Pseudohyphen gefunden. Bei einigen dieser blaugrünen Kolonien konnten jedoch auch nach 10-tägiger Bebrütung keine Chlamydosporen beobachtet werden.

Abbildung 4: Auf Reisagar angezüchtet *C. albicans* mit Hyphen (H) und Chlamydosporen (C).



Mit dem Api-System ID-32 C konnten die meisten *C. albicans* als Biotyp 1 mit dem Profil 7340 3400 (ausgezeichnete Identifizierung) identifiziert werden. Biotyp 2 (*C. stellatoidea*) mit dem Profil 3142 3000 (ausgezeichnete Identifizierung) wurde für 9 *C. albicans*-Isolate erhalten. Bei der Identifizierung von 32 *C. albicans*-Stämmen (s. Tabellen 17 - 19 ab Seite 53) und von den meisten der 37 non-*C. albicans*-Stämmen (s. Tabelle 16, Seite 45) waren die Ergebnisse mit dem Api-System allerdings problematisch, da sie sich entweder keinem oder nicht ausreichend sicher einem bestimmtem Profil zuordnen ließen.

Alle *Candida albicans*-Stämme, die mit diesen drei Methoden (Differentialnährboden ALBICANS ID-Agar®, Mikromorphologie auf Reisagar und Api-System ID 32-C) abweichende morphologische und biochemische Eigenschaften aufwiesen und deshalb nicht klar identifizierbar waren, werden in der vorliegenden Arbeit als "atypische Stämme" bezeichnet.

Das Identifizierungssystem Api-Zym hat in unseren Studien wenig zufriedenstellende Ergebnisse gezeigt. Dieses System erlaubt den schnellen semiquantitativen Nachweis von 19 Enzymaktivitäten in sehr geringen Probenmengen. Die Technik eignet sich für alle Untersuchungsmaterialien wie z.B. Gewebe, Zellen, biologische Flüssigkeiten, Mikroorganismen, Spülflüssigkeiten, Bodenproben, Öl u.a. und ist mit einer Inkubationszeit von 4 Stunden schnell durchführbar. Dieses System erreicht nicht die Präzision spektrometrischer und elektrophoretischer Messmethoden, wird aber verwendet, um Untersuchungsmaterialien auf Enzymaktivitäten zu prüfen, die dann bei Bedarf mit genaueren Methoden exakt bestimmt werden können. Im Vergleich zum Api-zym-Test wurden mit dem Api ID 32 C deutlich mehr Stämme erfaßt. Außerdem ist das Api-Zym-System lediglich ein Enzymnachweis und nicht primär eine Methode zur Speziesidentifizierung. Es ist nicht auszuschließen, daß gleiche Enzymkonstellationen bei unterschiedlichen Organismen vorhanden sein können. Aus diesen Gründen und aus Kostengründen haben wir uns für das Api ID 32 C-System für die biochemische Charakterisierung der *Candida*-Isolate entschieden.

3.2 Konventionelle und molekularbiologische Identifizierung schwer differenzierbarer *Candida*-Stämme

3.2.1 Differenzierung von *C. guilliermondii* und *C. famata*

3.2.1.1 Ergebnisse konventioneller Identifizierungsmethoden

In der vorliegenden Arbeit wurden konventionelle und molekularbiologische Verfahren für die Differenzierung von insgesamt 37 *C. guilliermondii*/ *C. famata*-Isolaten, die von Patienten der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Charité stammten, eingesetzt. Andere Probenmaterialien außer Hautproben standen nicht zur Verfügung. Die konventionelle Diagnostik erfolgte mittels Biochemotypie mit dem Api-System ID-32 C und durch den Nachweis der Pseudomyzelbildung auf Reisagar. Nur für 2 Stämme konnte jedoch die Ausbildung von Pseudomyzelien eindeutig nachgewiesen werden.

Die API-Profile der in dieser Studie getesteten als *C. guilliermondii*/ *C. famata*-Isolate sind in [Tabelle 16](#) dargestellt. Für die unter 1-4 erfaßten Isolate wurde aufgrund einer fraglichen Pseudomyzelbildung sowie aufgrund klinischer Angaben die Verdachtsdiagnose *C. guilliermondii* gestellt. Die beiden Stämme, die eindeutig Pseudomyzelien ausbildeten, sind unter Punkt 5 aufgelistet. Wegen fehlender klinischer Symptome und fehlender Pseudomyzelbildung wurde vermutet, daß es sich bei den übrigen Isolaten (6-13) um *C. famata* handelt.

Mit dem API-System konnten nur die 23, unter 4 und 5 aufgelisteten, Isolate mit der Profilnummer 5577 3521 als *C. guilliermondii* identifiziert werden. Für den unter (1) beschriebenen Stamm konnte keine Differenzierung zwischen *C. guilliermondii* und *C. famata* erreicht werden, während die Stämme unter den Punkten (3) sowie (6-8) aufgrund ihres API-Profiles eher der Spezies *C. famata* zugeordnet werden müßten. Für die übrigen Stämme war eine Identifizierung mit dem API-System überhaupt nicht möglich.

Tabelle 16: Zusammenfassung der Ergebnisse konventioneller und molekularbiologischer Methoden für die Identifizierung fraglicher *C.guilliermondii*/ *C.famata*-Isolate

Anzahl der Stämme	Pseudohyph	Identifizierung mit Api 32C (V. 1)		Molekulare Diagnostik	Reihe
		Profil	Ergebnisse aus Datenbank		
1	nein	5177 3521	<i>C. famata</i> %id= 58 <i>C. guilliermondii</i> %id= 40 Gute Identifizierung auf Genus Ebene	<i>C. guilliermondii</i>	1
1	nein	5577 1501	nicht vorhanden	<i>C. guilliermondii</i>	2
4	nein	5577 3501	<i>C. famata</i> %id= 81 <i>C. guilliermondii</i> %id= 19 Ausgezeichnete Identifizierung auf Genus Ebene	<i>C. guilliermondii</i>	3
21	nein	5577 3521	<i>C. guilliermondii</i> %id= 88 <i>C. famata</i> %id= 12 Ausgezeichnete Identifizierung auf Genus Ebene	<i>C. guilliermondii</i>	4
2	ja	5577 3521	<i>C. guilliermondii</i> %id= 88 <i>C. famata</i> %id= 12 Ausgezeichnete Identifizierung auf Genus Ebene	<i>C. guilliermondii</i>	5
1	nein	5577 3561	<i>C. famata</i> %id= 93,8 Gute Identifizierung	<i>C. guilliermondii</i>	6
1	nein	7577 3543	<i>C. famata</i> %id= 99,3 Sehr gute Identifizierung	<i>C. guilliermondii</i>	7
1	nein	5577 3553	<i>C. famata</i> %id= 97,4 Gute Identifizierung	<i>C. famata</i>	8
1	nein	5777 1503	nicht vorhanden	<i>C. famata</i>	9
1	nein	5777 3551	nicht vorhanden	<i>C. famata</i>	10
1	nein	5177 1743	nicht vorhanden	non-famata / non-guilliermondii	11
1	nein	5567 3501	nicht vorhanden	non-famata / non-guilliermondii	12
1	nein	5777 1703	nicht vorhanden	non-famata / non-guilliermondii	13

Bei der Biochemotypie wurden somit sowohl Stämme, deren Profile nicht erfaßt sind, als auch Profile, die von einer schlechten bis zu einer sehr guten Identifizierung reichen, innerhalb dieser beiden *Candida*-Arten gefunden.

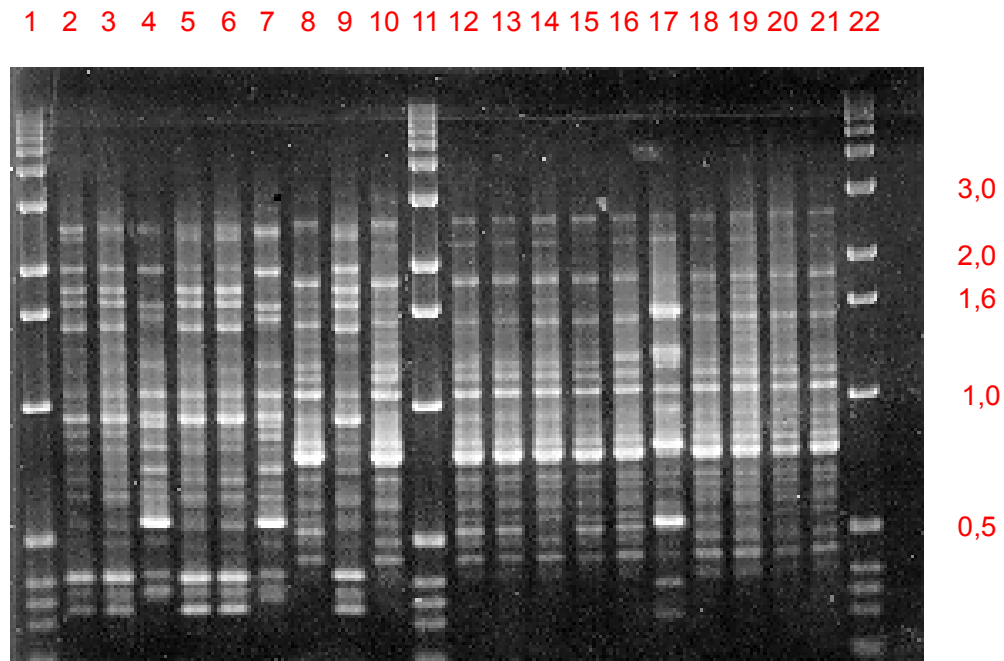
3.2.1.2 Ergebnisse molekularbiologischer Identifizierungsmethoden

3.2.1.2.1 PCR-Fingerprinting

Unsere Arbeitsgruppe konnte in früheren Untersuchungen zeigen ([Thanos et al. 1996](#)), daß bei Amplifizierung der genomischen DNA unterschiedlicher *Candida*-Arten mit einzelnen unspezifischen Primern speziesspezifische Amplifikationsprodukte erhalten werden. Durch den Vergleich der PCR-Fingerprints klinischer Isolate mit denen entsprechender Referenzstämmen war es möglich, *Candida*-Spezies korrekt zu identifizieren. Da die *C.guilliermondii*- und *C.famata*-Referenzstämmen mit dieser Fingerprint-Technik gut diskriminiert werden konnten, haben wir diese Methode in unserer Studie für die Differenzierung der *C.guilliermondii* / *C.famata*-Stämme eingesetzt. Wir haben dafür zunächst die Primer T3B und M13 Core-Sequenz verwendet, die beide stets übereinstimmende Ergebnisse lieferten. Bei späteren Versuchen wurde dann nur noch Primer T3B eingesetzt, da die mit ihm erhaltenen Profile eindeutiger und leichter auswertbar waren.

Wie in [Abbildung 5](#) zu sehen ist, wurden für *C. guilliermondii* vs. *C. famata* deutlich unterschiedliche PCR-Fingerprints mit dem Primer T3B beobachtet, die eine klare Zuordnung der klinischen Isolate (Bahnen 8, 10, 14-16, 18-21: *C. guilliermondii*; Bahnen 5, 6, 9: *C. famata*) gestatteten. Einige PCR-Profile entsprachen jedoch weder denen von *C. guilliermondii* noch denen für *C. famata*. Derartige Isolate wurden als non-*famata* / non-*guilliermondii* Isolate bezeichnet (Bahnen 4, 7, 17). Eine Identifizierung war auch nach Vergleich mit den PCR-Profilen der 26 bisher untersuchten *Candida*-Spezies ([Thanos et al. 1996](#)) nicht möglich.

Abbildung 5: PCR-Fingerprint-Muster ausgewählter *C.famata*/ *C.guilliermondii*-Isolate erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B.



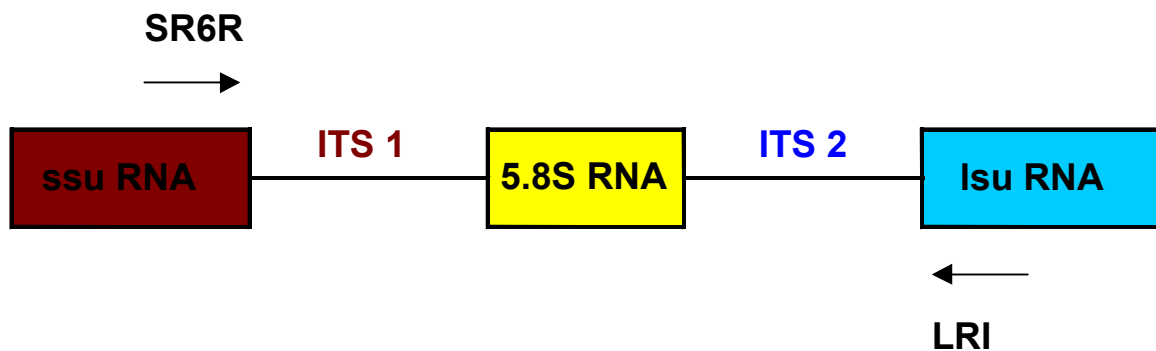
Bahnen 1, 11 und 22: 1 kb-Molekulargewichtsmarker
Bahnen 2-3: Referenzstämme von *C. famata* (CBS 1795)
Bahn 4: non-famata / non-guilliermondii
Bahn 5: *C. famata*
Bahn 6: *C. famata*
Bahn 7: non-famata / non-guilliermondii
Bahn 8: *C. guilliermondii*
Bahn 9: *C. famata*
Bahn 10: *C. guilliermondii*
Bahnen 12-13: Referenzstämme von *C. guilliermondii* ATCC 6260
Bahn 14: *C. guilliermondii*
Bahn 15: *C. guilliermondii*
Bahn 16: *C. guilliermondii*
Bahn 17: non-famata / non-guilliermondii
Bahn 18: *C. guilliermondii*
Bahn 19: *C. guilliermondii*
Bahn 20: *C. guilliermondii*
Bahn 21: *C. guilliermondii*

3.2.1.2.2 Restriktionsanalyse der amplifizierten ITS-Region

Die „internal transcribed spacer“ im ribosomalen Operon sind hypervariable DNA-Regionen, die bei vielen Mikroorganismen für die Identifizierung auf Speziesebene genutzt werden. Diese nichtkodierenden Sequenzen ([Abbildung 6](#)) liegen zwischen den Genen für die „small subunit“ (ssu) rRNA und für die 5.8S rRNA einerseits (ITS1) und zwischen den Genen für die 5.8S rRNA und die „large subunit“ (lsu) rRNA andererseits

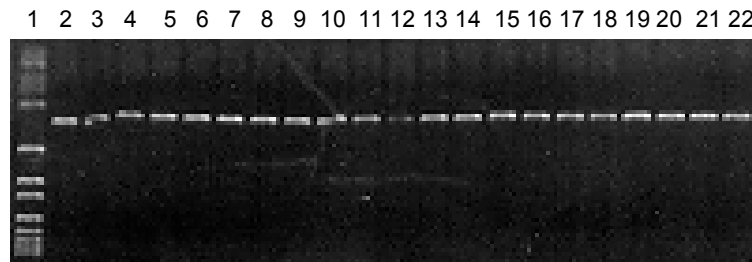
(ITS 2). Bei *Candida albicans* sind die ribosomalen Gene, einschließlich der ITS-Regionen, in 50-100 Kopien, tandemförmig wiederholt, auf dem R-Chromosom lokalisiert. Die ITS-Regionen unterschiedlicher *Candida*-Spezies unterscheiden sich sowohl in ihrer Länge als auch in ihrer Nukleotidzusammensetzung (Nho et al. 1997, Williams et al. 1995, Lott et al. 1993). Nach Amplifizierung der beiden Spacer einschließlich des 5.8S rRNA-Gens und nach Verdauung des PCR-Produkts mit verschiedenen Restriktionsenzymen konnten Williams und Mitarbeiter (1995) 8 *Candida*-Spezies, darunter *C. albicans* und *C. guilliermondii*, klar differenzieren. Nho et al. (1997) verwendeten das gleiche Verfahren für die Diskriminierung von *C. krusei*, *C. inconspicua* und *C. norvegensis*.

Abbildung 6: Schematische Darstellung der Gesamt-ITS-Region mit der Lokalisation der in der PCR verwendeten Primer.



Wir haben die ITS-Regionen der *C. guilliermondii* / *C. famata*-Isolate mit den von Vilgalys et al. und von White et al. (1990) entwickelten pilzspezifischen Primern LR1 und SR6R amplifiziert (Abbildung 7). Die PCR-Produkte unterschieden sich mit 640 bp für *C. guilliermondii* und 670 bp für *C. famata* nur gering in ihrer Größe. Nach Spaltung der Amplifikate mit den Restriktionsenzymen Hae III und Dde I konnten jedoch die beiden Spezies gut unterschieden werden (Abbildung 8). Dabei konnte der Stamm in Bahn 3a und 3b, der auf Grund fehlender Pseudohyphenbildung konventionell als *C. famata* bestimmt worden war, eindeutig als *C. guilliermondii* identifiziert werden.

Abbildung 7: Amplifizierung der ITS-Regionen von *C. guilliermondii* /*C. famata* mit den Primern SR6R und LR1



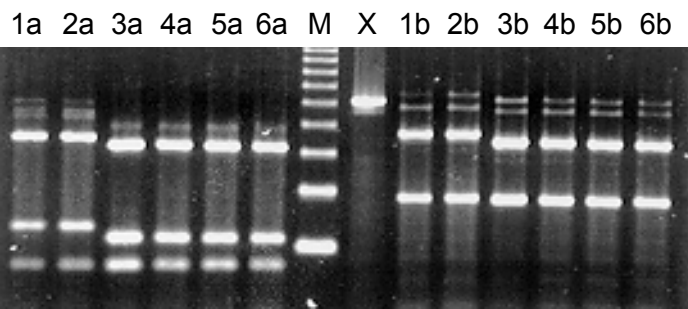
Bahn 1: 123 bp DNA-Leiter (Molekulargewichtsmarker)

Bahn 2 und 3: Referenzstämme von *C. famata* CBS 1795

Bahn 4 und 5: Referenzstämme von *C. guilliermondii* ATCC 6260

Bahn 6 bis 22: klinische Isolate von *C. guilliermondii* /*C. famata*

Abbildung 8: Spaltung der amplifizierten ITS-Regionen von *C. famata* und *C. guilliermondii* mit den Restriktionsendonukleasen Hae III (a) und Dde I (b).



Bahn 1a, 2a und 1b, 2b: Referenzstämme von *C. famata* CBS 1795

Bahn 3a und 3b: *C. famata* (*C. guilliermondii* bestätigt)

Bahn 4a, 5a und 4b, 5b: Referenzstämme von *C. guilliermondii* (ATCC 6260)

Bahn 6a und b: *C. guilliermondii* (klinisches Isolat)

Bahn M: 123 bp DNA-Leiter (Molekulargewichtsmarker)

Bahn X: ungespaltener Spacer

3.2.1.3 Vergleich der Ergebnisse konventioneller phänotypischer und molekularbiologischer Methoden für die Identifizierung von *C. guilliermondii* und *C. famata*

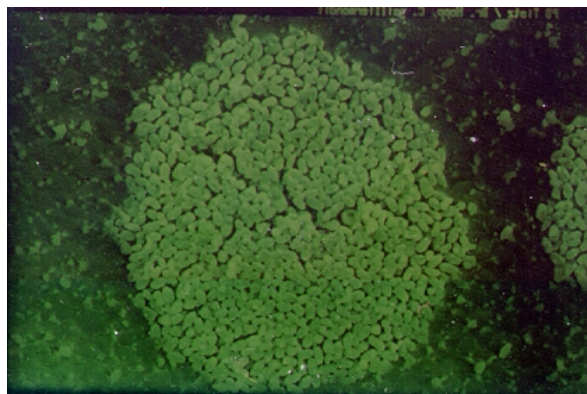
Im folgenden soll anhand eines klinischen Beispiels die Differenzierung von *C. guilliermondii* und *C. famata* im Detail beschrieben werden:

Bei der Patientin S.C., 45 Jahre, mit der klinischen Diagnose therapierefraktäre chronisch rezidivierende Onychomykose ([Abbildung 9](#)), wurden von den Fingernägeln Hefen isoliert, die auf Reisagar keine Pseudomyzelien bildeten ([Abbildung 10](#)). Mit dem API-System ID 32-C wurde das Profil 5577 1503 bestimmt, welches in der Datenbank eine gute Identifizierung (%id =98,5) als *C. famata* ergab.

Abbildung 9: Chronisch rezidivierende Onychomykose bei der Patientin S.C.

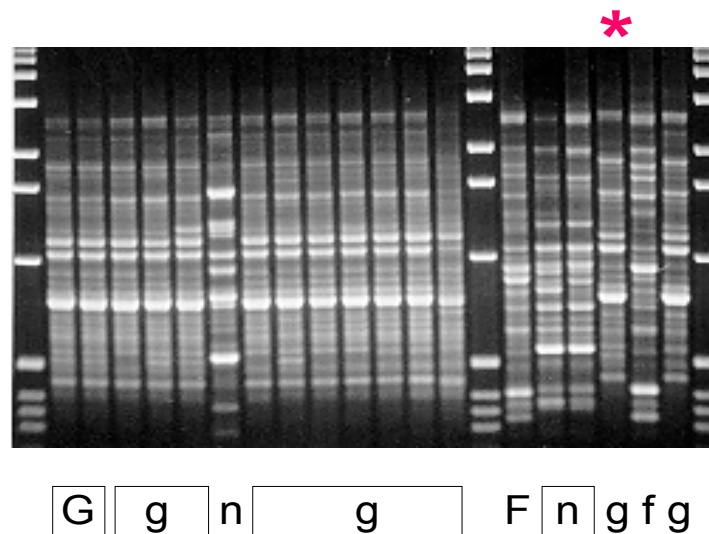


Abbildung 10: Stamm der Patientin S.C. ohne Pseudomyzelbildung auf Reisagar



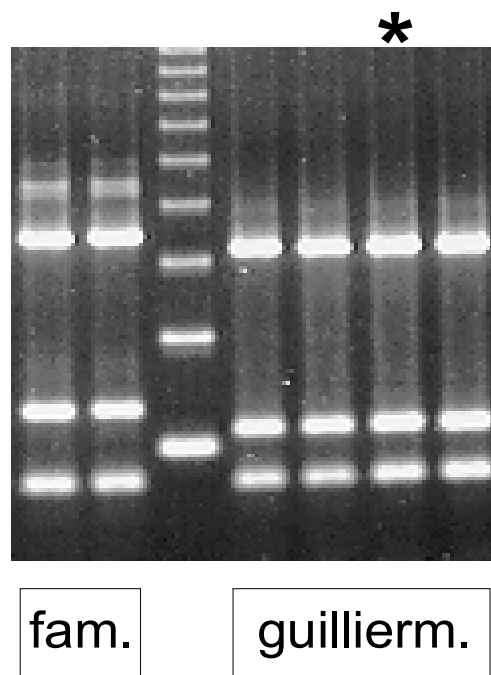
Die molekularbiologische Diagnostik mit dem PCR-Fingerprinting ([Abbildung 11](#)) sowie auch die Restriktionsanalyse der amplifizierten ITS-Regionen ([Abbildung 12](#)) ergaben als Speziesdiagnose jedoch *C. guilliermondii*.

Abbildung 11: PCR-Fingerprint-Muster ausgewählter *C.famata*/ *C.guilliermondii*-Isolate erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B.



G: *C. guilliermondii*-Referenzstämme ATCC 6260; g: klinische Isolate von *C. guilliermondii*; F: Referenzstämme von *C. famata* CBS 1795; f: klinisches Isolat von *C. famata*; n: non-guilliermondii / non-famata -Isolate; *: Isolat der Patientin S.C.

Abbildung 12: Spaltung der amplifizierten ITS-Regionen von *C. famata* und *C. guilliermondii* mit der Restriktionsendonuklease Hae III.



*: Patienten-Isolat

C. famata sind nicht als Erreger von Dermatomykosen beschrieben, sondern werden lediglich als Kontaminanten angesehen. Somit führte die Identifizierung dieses Patientenisolats als *C. guilliermondii* zur Bestätigung der Erkrankung als therapiepflichtige Mykose. Für diesen *C. guilliermondii*-Stamm wurde von unserer Arbeitsgruppe (Tietz and Czaika 1999) eine Hoch-Resistenz gegenüber Fluconazol und Itraconazol festgestellt. Da für die systemische Therapie von Infektionen durch Hefepilze nur diese beiden Azole zur Verfügung stehen, Griseofulvin und Terbinafin sind unwirksam, war eine systemische Therapie unmöglich. In dem Fall unserer Patientin blieb so der Einsatz von Lokalantimykotika die einzige Möglichkeit.

Insgesamt haben wir die Ergebnisse der konventionellen und der molekularbiologischen Identifizierung für 37 fragliche *C. guilliermondii* / *C. famata*-Isolate verglichen (Tabelle 16). Nur bei zwei dieser Isolate konnte die Diagnose *C. guilliermondii* aufgrund der eindeutigen Bildung von Pseudomyzelien auf Reisagar gestellt werden.

Mit dem PCR-Fingerprinting und der RFLP-Analyse der ITS-Region konnten 31 der getesteten Isolate als *C. guilliermondii* identifiziert werden (Tabelle 16: Reihe 1 bis 7). 23 dieser Stämme wurden auch mit dem API-System ID 32C sicher erkannt (Reihe 4-5), die alle das gleiche API-Profil 5577 3521 aufwiesen. Bei 5 Stämmen konnte in der Biochemotypie nicht zwischen *C. guilliermondii* und *C. famata* diskriminiert werden (Reihe 1 + 3). Weitere zwei Stämme wurden sogar mit sehr guter bzw. guter Identifizierung als *C. famata* diagnostiziert (Reihe 6-7), während das API-Profil eines *C. guilliermondii*-Stamms überhaupt keine Aussagen gestattete (Reihe 2).

Drei der 37 untersuchten Isolate erwiesen sich nach Durchführung des PCR-Fingerprinting und der RFLP-Analyse der ITS-Region als *C. famata* (Reihe 8-10), nur einer dieser Stämme wurde auch in der Biochemotypie erkannt (Reihe 8). Für zwei *C. famata*-Isolate konnte im API-System keine Spezieszugehörigkeit ermittelt werden (Reihe 9-10). Drei non-*guilliermondii* / non-*famata*-Isolate, deren API-Profile in der API-Datenbank nicht vorhanden waren und die auch mit den molekularen Techniken nicht identifiziert werden konnten, müssen noch zugeordnet werden (Reihe 11-13).

3.2.2 Identifizierung von *Candida albicans*-Stämmen mit atypischen morphologischen und biochemischen Eigenschaften

3.2.2.1 Ergebnisse konventioneller Identifizierungsmethoden

In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse konventioneller und molekularbiologischer Identifizierungsmethoden auch für *Candida*-Isolate mit atypischen morphologischen und biochemischen Eigenschaften verglichen. 9 klinische *Candida*-Stämme aus Deutschland wiesen untypische Profile im API-System ID 32 C auf, wie in [Tabelle 17](#) angegeben. Die untypischen API-Profile waren durch die fehlende Assimilation von 2-Ketogluconat (2KG) und Xylose (XYL) bedingt. Laut Angaben des Herstellers sind 100%- bzw. 98% aller *Candida albicans*-Stämme in der Lage, diese beiden Substrate zu verwerten. Sowohl die Xylose-negativen als auch die 2KG-negativen Stämme waren in den übrigen phänotypische Merkmalen unauffällig im Vergleich zu „normalen“ *C. albicans*-Populationen.

Tabelle 17: Atypische *Candida*-Isolate aus Deutschland

Erreger	ID-32 C	Anzahl	Profil (bioMerieux Datenbank V.1)
2KG negative-Stämme	7345 3400	4	nicht vorhanden
XYL negative-Stämme	7347 1400	5	<i>C. albicans</i> %id= 99,9 Sehr gute Identifizierung

Aus Afrika stammen die in der [Tabelle 18](#) und [Tabelle 19](#) aufgelisteten atypischen *Candida*-Isolate, bei denen folgende API-Profile gefunden wurden, wobei das Profil 7046 3400 dominierte.

Tabelle 18: Atypische *Candida*-Isolate aus Angola

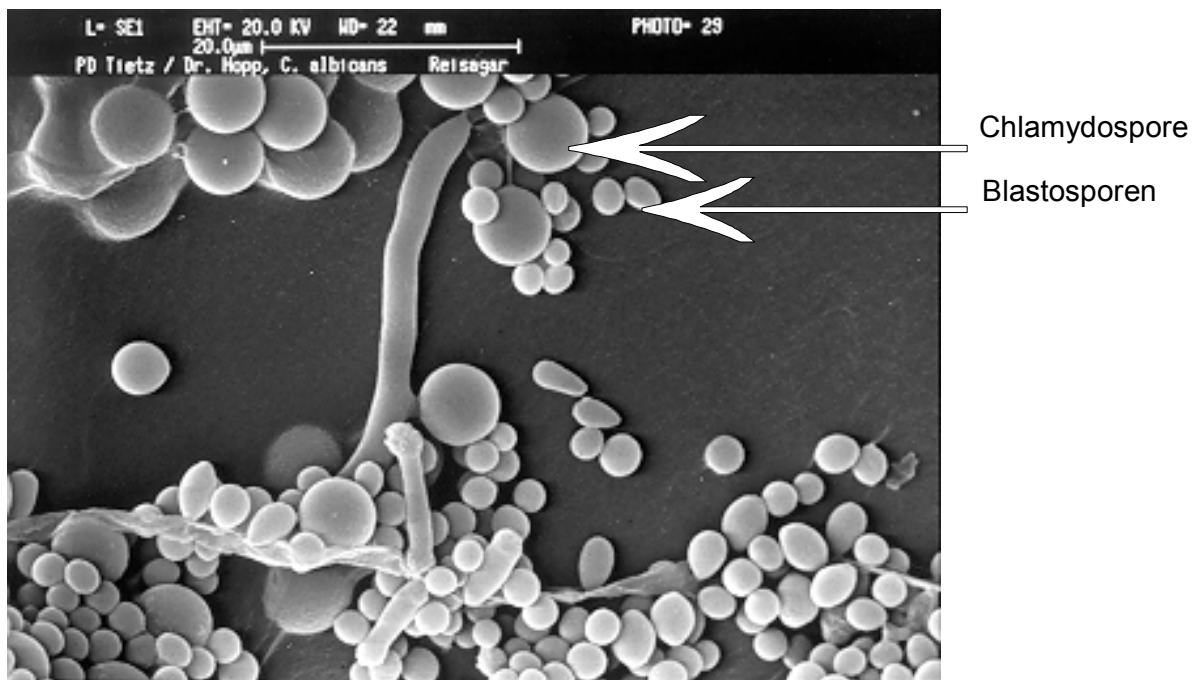
Stamm-Nr.	(bioMerieux Datenbank V.1)	
	ID-32 C	Profil
AA 1634	7040 3400	nicht vorhanden
AA 1587	7042 3400	<i>Candida sake</i> %id= 99,2 Gute Identifizierung
AA 1605	7046 3400	nicht vorhanden
AA 1622g	7046 3400	nicht vorhanden
AA 1078	7046 3400	nicht vorhanden
AA 579	7046 3400	nicht vorhanden
AA 759	7046 3400	nicht vorhanden
AA 1598	7047 3400	nicht vorhanden
AA 1618	7047 3400	nicht vorhanden

Tabelle 19: Atypische *Candida*-Isolate aus Madagaskar

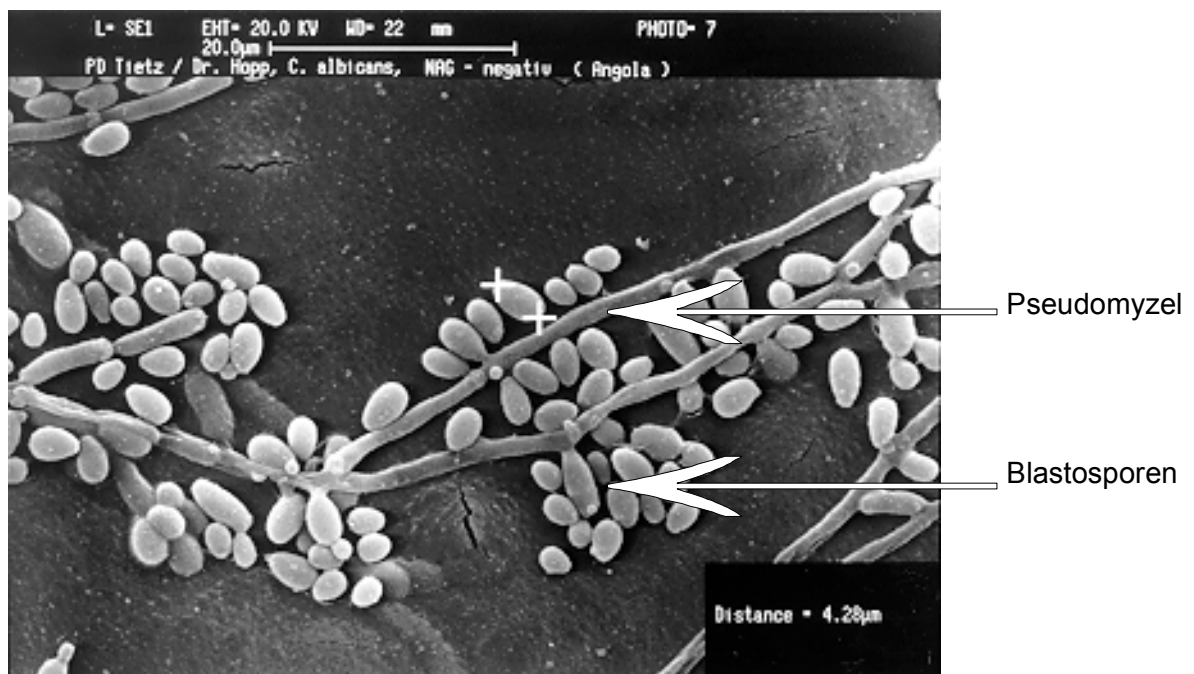
Stamm-Nr.	(bioMerieux Datenbank V.1)	
	ID-32 C	Profil
MA 1649	3142 3000	<i>C. stellatoidea</i> %id= 99,7 Ausgezeichnete Identifizierung
MA 2	7045 3400	nicht vorhanden
MA 11	7046 3400	nicht vorhanden
MA 82	7046 3400	nicht vorhanden
MA 268	7046 3400	nicht vorhanden
MA 335	7046 3400	nicht vorhanden
MA 1653	7046 3400	nicht vorhanden
MA 1654	7046 3400	nicht vorhanden
MA 1655	7046 3400	nicht vorhanden
MA 1660	7046 3400	nicht vorhanden
MA 1669	7046 3400	nicht vorhanden
MA 8621	7046 3400	nicht vorhanden
MA 8627	7046 3400	nicht vorhanden
MA 8640	7046 3400	nicht vorhanden

Alle afrikanischen Stämme waren ausnahmslos durch ein verlangsamtes Wachstum in Vergleich zu den anderen Stämmen gekennzeichnet, waren positiv im Keimschlauchtest in humanem Serum, wuchsen als blaugrüne Kolonien auf ALBICANS ID-Agar ([Abbildung 2, Seite 41](#)) und bildeten Pseudohyphen ([Abbildung 13 B](#)). Sie waren jedoch unfähig, die für *C. albicans* typischen Chlamydosporen ([Abbildung 13 A](#)) auf Reisagar auszuprägen und die Aminosäure Glukosamin und N-Acetylglukosamin zu assimilieren ([Abbildung 14](#)).

Abbildung 13: *C. albicans*-Stämme auf Reisagar, (A) mit und (B) ohne Chlamydosporenbildung.

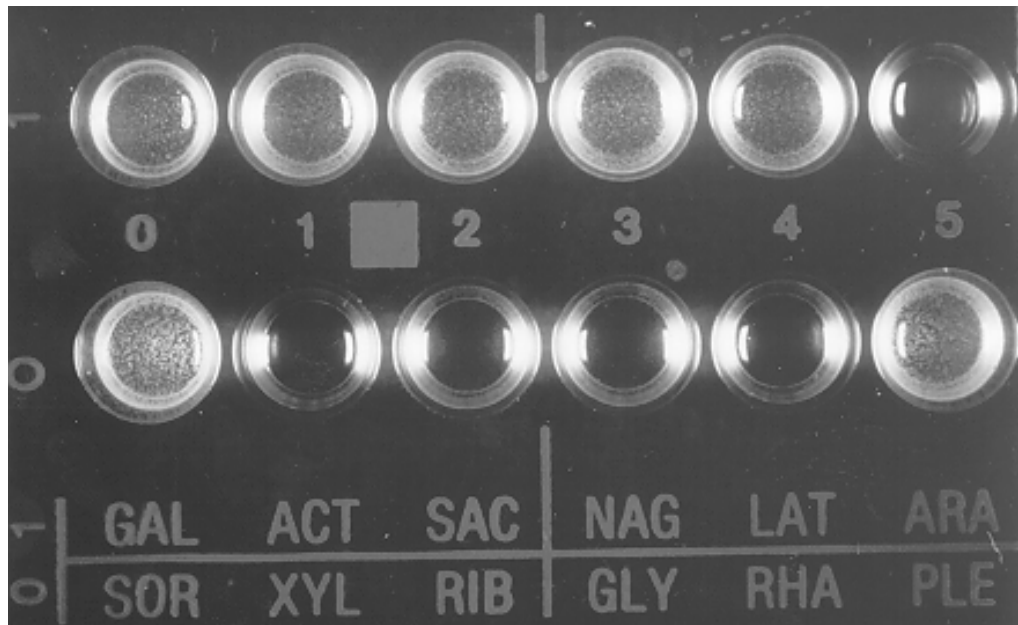


A

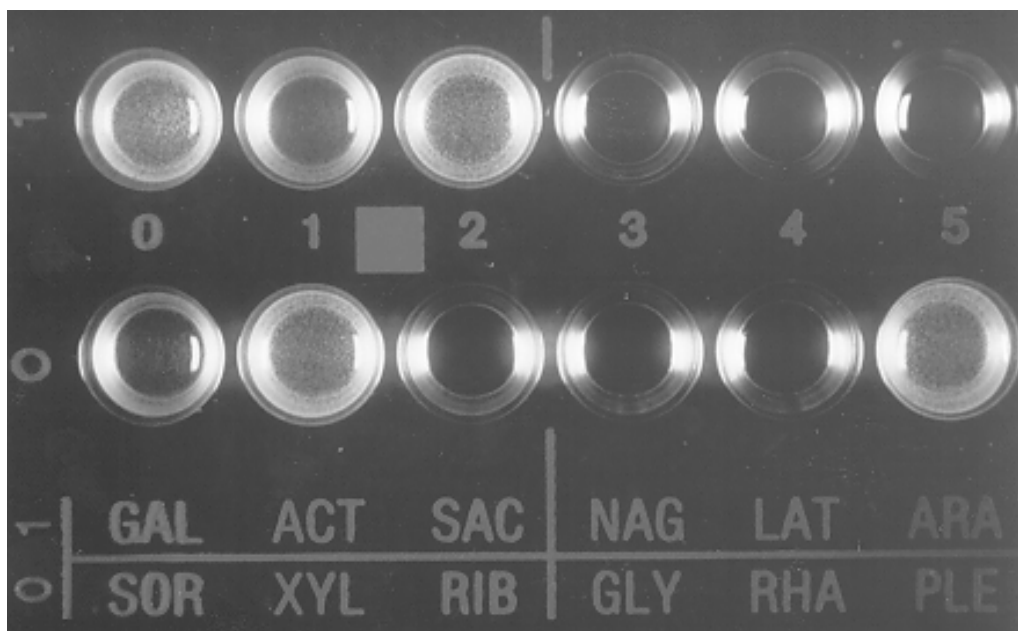


B

Abbildung 14: ID-32C-Profil von typischen *C. albicans* des Biotyps 1 (A) und von atypischen NAG-negativ Stämmen (B).



A

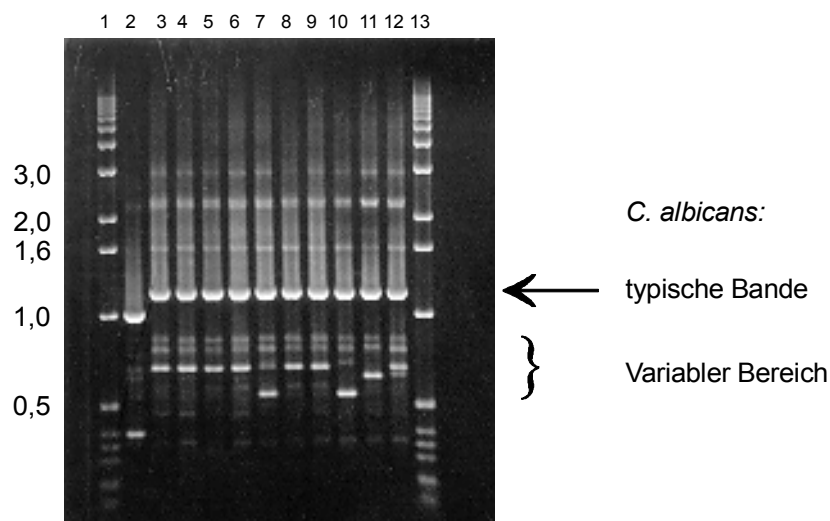


B

3.2.2.2 Ergebnisse des PCR-Fingerprintings

Die Spezieszugehörigkeit aller atypischen *Candida*-Isolate wurde mit dem PCR-Fingerprinting (Primer T3B) überprüft. In früheren Studien (Thanos et al. 1996, Schönian et al. 1993a-b) konnte gezeigt werden, daß diese PCR-Fingerprints spezie-spezifisch waren, wobei bei unterschiedlichen *Candida*-Arten nur 10-50% der amplifi-zierten Fragmente übereinstimmten. Stämme der gleichen Spezies wiesen jedoch im Rahmen des artspezifischen Musters auch stammsspezifische Unterschiede auf. Die mit Primer T3B erhaltenen PCR-Fingerprints unterschiedlicher *C. albicans*-Stämme waren nur zu ca. 88-95% identisch. Die PCR-Profile von *C. albicans* waren stets sehr charak-teristisch und wiesen immer eine prominente Bande bei ca. 1160 bp auf, die bei keiner anderen getesteten *Candida*-Spezies gefunden wurde. Die meisten Unterschiede bei den *C. albicans*-Stämmen wurden in den T3B-Profilen im Molekulargewichtsbereich zwischen 800 und 500 bp beobachtet. In diesem Bereich unterschieden sich z.B. auch die beiden *C. albicans*-Referenzstämme CBS 562 und CBS 5983 (Abbildung 15).

Abbildung 15 PCR-Fingerprint-Muster 2KG- und XYL-negativer *Candida*-Isolate aus Deutschland erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B

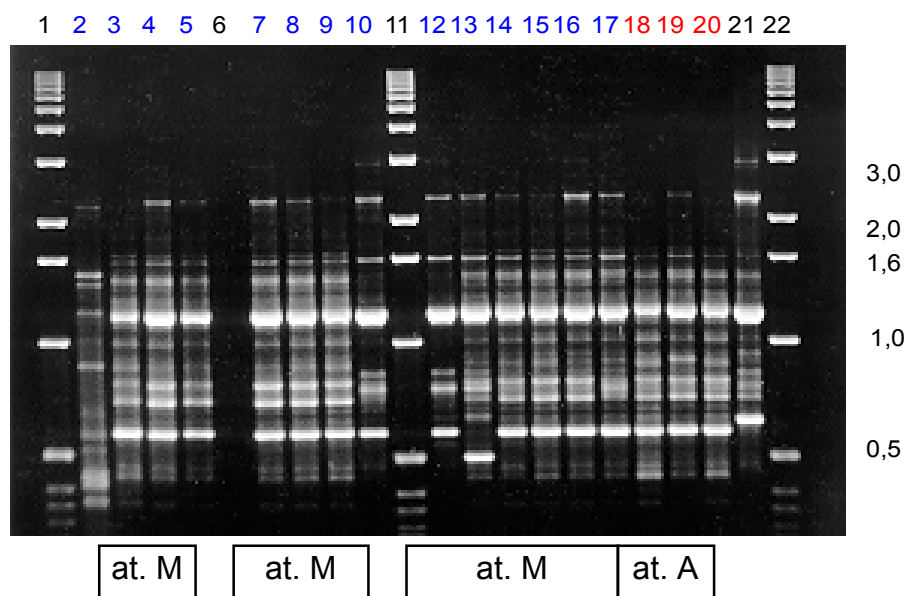


Bahnen 1, und 13: 1 kB-Leiter; Bahn 2: klinisches *C. dubliniensis*-Isolat; Bahnen 3-5: 2KG-negative *Candida*-Stämme; Bahnen 6-10: XYL-negative *Candida*-Stämme; Bah-nen 11-12: *C. albicans*-Referenzstämme CBS 562 und CBS 5983.

Die atypischen Stämme aus Deutschland erwiesen sich eindeutig als *C. albicans*-Stämme ohne klare Unterschiede zu den als "normal" bezeichneten Isolaten ([Abbildung 15](#)). Zwei der XYL-negativen Stämme zeigten Unterschiede zu den anderen *C. albicans*-Isolaten im variablen Bereich des PCR-Profiles. Lediglich das PCR-Profil des Isolats in Bahn 2 wich von dem für *C. albicans* typischen Amplifikationsmuster ab. Dieser PCR-Fingerprint entsprach dem von *C. dubliniensis*, einer kürzlich beschriebenen neuen *Candida*-Art (Schönian, pers. Mitteilung).

Die afrikanischen atypischen Stämmen wurden in dem PCR-Fingerprinting ebenfalls als *C. albicans* identifiziert ([Abbildung 16](#)) obwohl sie die für *C. albicans* charakteristischen Merkmale wie die Bildung von Chlamydosporen und die Verwertung der Aminosäure N-Acetylglukosamin und Glukosamin nicht ausprägten. Die Stämme hatten sehr ähnliche PCR-Muster, während bei den „typischen“ *Candida albicans*-Stämmen eine größere Heterogenität in ihren PCR-Profilen beobachtet wurde ([Tietz et al. 1995](#)).

Abbildung 16: PCR-Fingerprint-Muster atypischer *Candida*-Isolate aus Afrika erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B.



Bahnen 1, 11 und 22: 1 kb DNA-Leiter (Molekulargewichtsmarker); Bahn 2: *C. sake*-Referenzstamm CBS 159; Bahn 3-5, 7-10, 12-17: *Candida* atypisch aus Madagaskar; Bahn 18-20: *Candida* atypisch aus Angola; Bahn 21: *C. albicans*-Referenzstamm CBS 562.

3.3 Charakterisierung von *C. albicans*-Vaginalisolaten aus Afrika und Europa

3.3.1 Phänotypische Charakterisierung mit den in der Routinediagnostik angewendeten konventionellen Methoden

Bei 6 verschiedenen *Candida albicans*-Populationen ([Tabelle 20](#)) aus Angola (2 Populationen), Madagaskar, Deutschland (2 Populationen) und Portugal wurde die Variabilität phänotypischer und genotypischer Merkmale untersucht. In diese Analyse wurden neben *C. albicans*-Stämmen mit normalem Biotyp (Populationen aus Deutschland, Portugal und eine Population aus Angola) auch die bereits im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen atypischen afrikanischen Stämme mit einbezogen.

Sowohl die typischen wie auch die atypischen Stämme stammten aus Routineuntersuchungen und wurden mit den üblichen konventionellen Methoden charakterisiert. Die *Candida albicans*-Stämme des Biotyps 1 waren phänotypisch ähnlich. Sie wurden ausnahmslos alle mit einem typischen Api 32 C Profil (7347 3400) als *Candida albicans* identifiziert, wiesen die blaugrüne Färbung auf ALBICANS-ID-Agar auf und bildeten Pseudohyphen und Chlamydosporen auf Reisagar. Die phänotypischen Eigenschaften der atypischen Stämme wurden bereits früher ([Seite 55](#)) beschrieben.

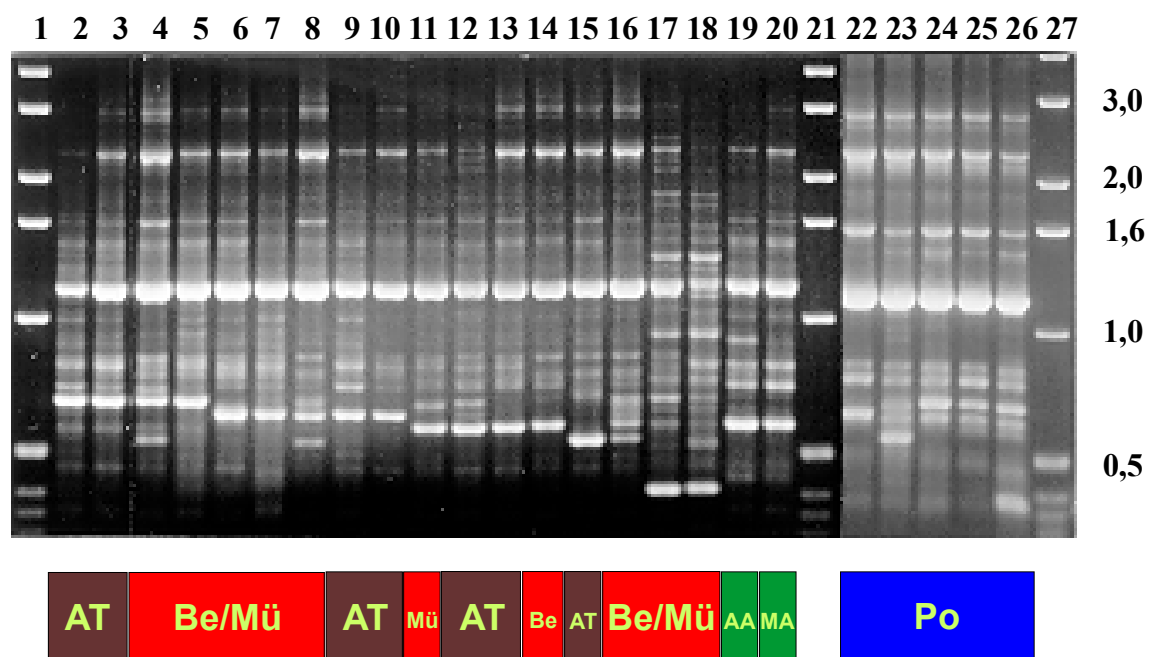
Tabelle 20: *Candida albicans*-Populationen aus Afrika und Europa

Population	Bezeichnung	Anzahl	ID-32 C-Profil (V.1)
<i>C. albicans</i> Biotyp 1 Angola	AT	49	7347 3400
<i>C. albicans</i> atypisch Angola	AA	8	verschiedene
<i>C. albicans</i> atypisch Madagaskar	MA	14	verschiedene
<i>C. albicans</i> Biotyp 1 Berlin	BE	47	7347 3400
<i>C. albicans</i> Biotyp 1 München	MÜ	45	7347 3400
<i>C. albicans</i> Biotyp 1 Lissabon	PO	49	7347 3400

3.3.2 Genetische Charakterisierung mit dem PCR-Fingerprinting

Wie bereits früher (Seite 25) ausgeführt, werden beim PCR-Fingerprinting neben speziesspezifischen auch eine Reihe von stammspezifischen PCR-Produkten erhalten, die für die Charakterisierung unterschiedlicher Stämme von *C. albicans* genutzt werden können. Wir haben deshalb diese Methode gewählt, um den Grad der genetischen Variabilität bei den in Tabelle 20 aufgeführten typischen und atypischen *C. albicans*-Populationen zu überprüfen. Die mit Primer T3B erhaltenen PCR-Profile ausgewählter Stämme aus allen 6 Populationen sind in Abbildung 17 dargestellt.

Abbildung 17 PCR-Fingerprint-Muster ausgewählter *C. albicans*-Isolate aus Afrika, Deutschland und Portugal erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B.



Bahnen / Isolat-Nr.	
1, 21 und 27: 1 kb-Molekulargewichtsmarker	
2-3: AT 66, AT 78	12-13: AT 93, AT 96
4: Be 157	14: Be 120
5: Mü 267	15: AT 94
6: Be 116	16-18: Be 112, Be 127, Be 145
7-8: Mü 288, Mü 287	19: AA 60
9-10: AT 62, AT 81	20: MA 49
11: Mü 278	22-26: PO 370-374

Bei wiederholter Durchführung des PCR-Fingerprinting für den gleichen *C. albicans*-Stamm wurden stets nahezu identische Amplifikationsmuster erhalten, gelegentlich waren Unterschiede in 1-2 schwachen Banden zu beobachten. Sehr große (> 3 kb) und sehr kleine (< 250 bp) Amplifikationsprodukte variierten häufiger und wurden deshalb aus der Analyse ausgeschlossen. Leichte Schwankungen in der Intensität der amplifizierten Banden, die bei der Auswertung vernachlässigt wurden, traten gelegentlich auf. Schwache Banden wurden nur berücksichtigt, wenn sie in wiederholten Experimenten konstant gefunden wurden. Um unterschiedliche Gele vergleichen zu können, wurde auf jedes Gel ein Fingerprint des *C.albicans*-Referenzstamms CBS 562 mit aufgetragen.

Für jeden *C. albicans*-Stamm der 6 untersuchten Populationen wurde eine 38-stellige binäre Matrix (0 = Bande ist nicht vorhanden; 1 = Bande ist vorhanden) erstellt. Dafür wurden mittels scannergestützter Hard- und Software zunächst die Molekulargewichte für jede einzelne Bande bestimmt, wobei der Referenzstamm CBS 562 jeweils als Standard diente.

Für die insgesamt 212 *C. albicans*-Isolate aus Afrika, Deutschland und Portugal wurden 87 unterschiedliche PCR-Fingerprint-Genotypen nachgewiesen, von denen aber nur 18 bei drei bzw. mehr als drei verschiedenen *C. albicans*-Stämmen. 14 weitere PCR-Fingerprints waren für jeweils 2 Stämme identisch, alle übrigen Stämme hatten individuelle Genotypen.

Die typischen *C. albicans*-Populationen aus Europa und Afrika zeigten keine grundsätzlich verschiedenen Muster, unterschieden sich aber im Ausmaß der genetischen Variabilität innerhalb der verschiedenen Populationen.

Die 92 Isolate aus Berlin und München wiesen 40 unterschiedliche PCR-Fingerprint-Profile auf ([Tabelle 21](#)), wobei in beiden Stammgruppen relativ oft übereinstimmende Genotypen (z.B. die Genotypen D, G, K, P) nachweisbar waren. Genotyp D wurde bei dieser Stammgruppe am häufigsten (13 Stämme) bestimmt. Nur 9 der 40 deutschen Fingerprint-Muster wurden bei drei und mehr Stämmen und weitere 8 Muster wurden bei jeweils zwei Stämmen gefunden. 23 *C. albicans*-Stämme aus diesen Populationen hatten demnach individuelle Genotypen.

Für die insgesamt 49 Isolate aus Portugal wurden 32 unterschiedliche PCR-Fingerprint-Muster ermittelt. 4 Genotypen waren bei mehr als zwei Stämmen identisch, wobei der häufigste Genotyp I bei 5 Stämmen auftrat, und weitere 6 Fingerprints stimmten bei jeweils 2 Stämmen überein.

Die afrikanischen *C. albicans*-Stämme waren durch eine geringere genetische Heterogenität gekennzeichnet. Für die 49 typischen Isolate aus Angola wurden nur 9 verschiedene PCR-Fingerprint-Muster erhalten. Dabei wurde bei 23 Stämmen der identische Genotyp A, bei 13 Stämmen Genotyp C und bei jeweils 4 Stämmen die Genotypen M und N nachgewiesen. Die verbleibenden 5 Stämme wiesen distinkte Amplifikationsmuster auf. Keine Übereinstimmungen gab es in den Fingerprint-Mustern zwischen den typischen und atypischen Isolaten aus Angola, obwohl sie von Patientinnen der gleichen Klinik stammten. Demgegenüber waren jedoch die PCR-Profile von 6 der 8 atypischen angolanischen Stämme und von 9 der 14 Stämme aus Madagaskar identisch (Genotyp B).

Tabelle 21: PCR-Fingerprint-Genotypen, die bei mehr als drei unterschiedlichen *C. albicans*-Stämmen nachgewiesen wurden (0 = Bande nicht vorhanden, 1 = Bande vorhanden).

Gruppen (Anzahl)	Genotypen	Stämme
A (= 24)	11000101001010000010100100110011000010	AT101
		AT102
		AT103
		AT104
		AT106
		AT107
		AT108
		AT109
		AT110
		AT78
		AT79
		AT80
		AT82
		AT83
		AT84
		AT85
		AT86
		AT87
		AT88
		AT89
		AT90
		AT92
		AT98
		PO357
B (= 15)	11000101001010101101010000010001010010	AA1587
		AA1598
		AA1605
		AA1618
		AA1626
		AA1634
		M11
		M1653
		M1654
		M1655
		M2
		M268
		M82
		M8627
		M8640

Gruppen (Anzahl)	Genotypen	Stämme
C (= 13)	11000101001010100010110100111001000010	AT64 AT65 AT66 AT67 AT68 AT69 AT70 AT72 AT73 AT74 AT75 AT76 AT77
D (= 13)	10000101001010000010100001000011000010	Be131 Be137 Be138 Be139 Be141 Be151 Be155 Mü272 Mü283 Mü284 Mü286 Mü289 Mü296
E (= 8)	10000101001010001010110100000011000010	Mü280 Mü281 Mü282 Mü285 Mü290 Mü293 Mü294 Mü295
F (= 7)	10000101001010001010100001000011000010	Mü297 Mü298 Mü299 Mü303 Mü304 Mü305 Mü308

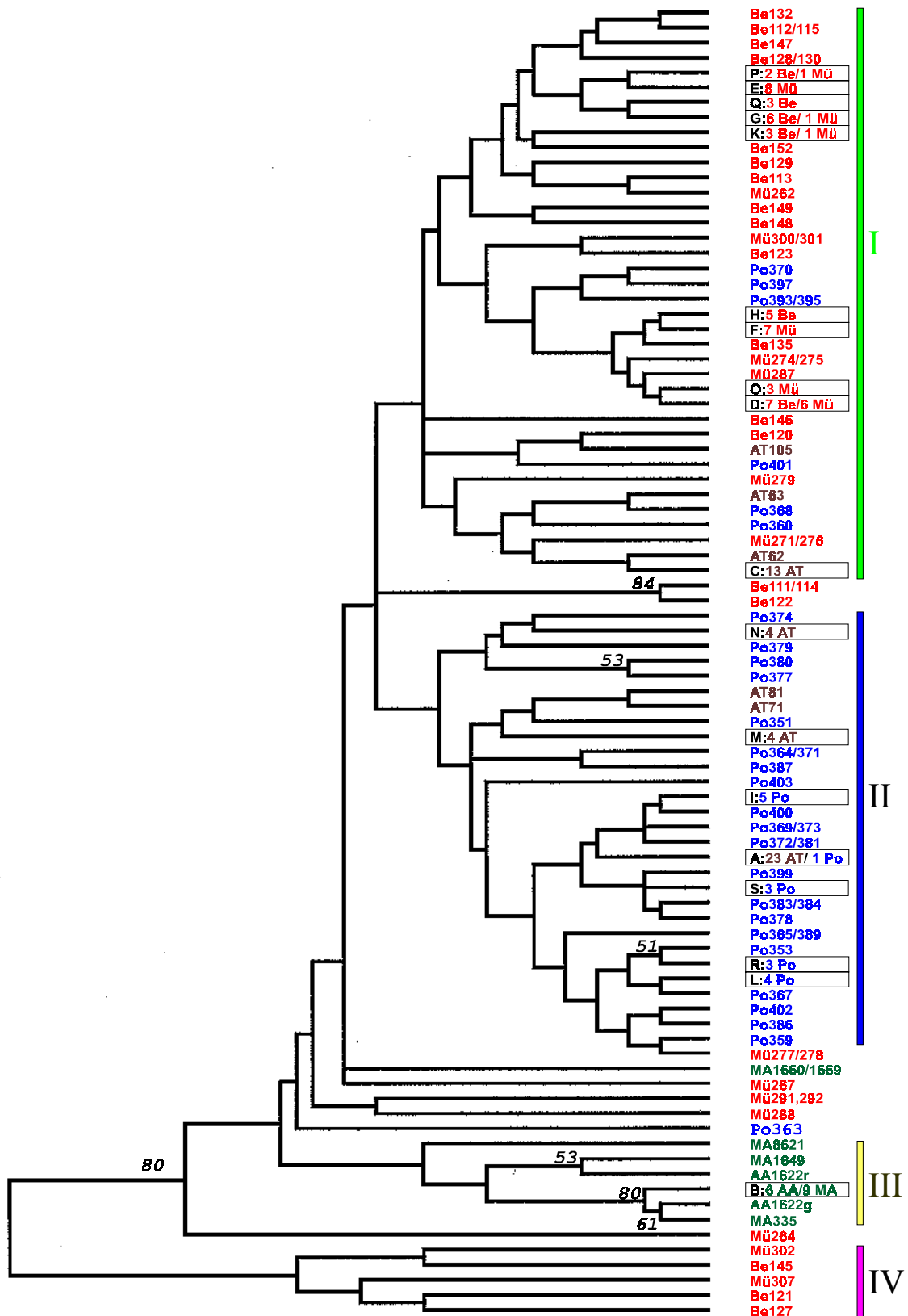
Gruppen (Anzahl)	Genotypen	Stämme
G (= 7)	11000101001010101010110100000011000010	Be119 Be126 Be133 Be134 Be140 Be142 Mü306
H (= 5)	10000101001010001010100001000001000010	Be116 Be117 Be118 Be124 Be136
I (= 5)	11000100101010000010100100100011000010	PO354 PO362 PO391 PO394 PO396
K (= 4)	10000011001010001010100100011011000010	Be156 Be157 Be158 Mü265
L (= 4)	11000100101010000010100000100011000010	PO390 PO392 PO398 PO404
M (= 4)	11000100101010100010101000100111000010	AT94 AT95 AT96 AT97
N (= 4)	11000100101110000010110100110001000010	AT100 AT91 AT93 AT99
O (= 3)	10000101001010000010100001000001000010	Mü263 Mü268 Mü270
P (= 3)	10000101001010000010100100000011000010	Be153 Be154 Mü266
Q (= 3)	1000010100101010101010110100010011000010	Be143 Be144 Be150
R (= 3)	11000100001010000010100000100011000010	PO355 PO358 PO361

Gruppen (Anzahl)	Genotypen	Stämme
S (= 3)	11000101001010000010100000100011000010	PO352 PO356 PO366

Sieht man von den Übereinstimmungen zwischen den atypischen Isolaten aus Angola und Madagaskar und zwischen den Isolaten aus Berlin und München ab, wurden zwischen den unterschiedlichen Populationen zwar einige ähnliche jedoch keine völlig übereinstimmenden Genotypen beobachtet. Eine Ausnahme bildete lediglich der portugiesische Stamm PO 357, der den bei den typischen angolanischen Stämmen häufigen Genotyp A aufwies. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß dieses Isolat von einer in Portugal lebenden afrikanischen Frau stammt.

Die Beziehungen zwischen den Fingerprint-Genotypen, die bei den Stämmen der 6 Populationen gefunden wurden, wurden mittels UPGMA-Distanz-Methode untersucht. In dem resultierenden Dendrogramm ([Abbildung 18](#)) sind die meisten Stämme der unterschiedlichen geographischen Populationen in einem großen Cluster zu finden, welches allerdings in die zwei Komplexe I und II unterteilt ist. Die meisten Stämme aus Berlin und München befinden sich im Komplex I, lediglich 7 Stämme aus Portugal und 16 Stämme aus Afrika ließen sich dieser Gruppierung zuordnen. Interessanterweise gehören zu Komplex II die übrigen afrikanischen Stämme mit normalem Biotyp (AT) und fast alle portugiesischen Stämme (PO). Alle atypischen Stämme aus Afrika bilden den gut separierten Komplex III. 5 Stämme aus Deutschland, deren Fingerprints deutlich von denen der meisten anderen Stämme abwichen, sind im Komplex IV zu finden. Generell sind die dargestellten Beziehungen zwischen den Isolaten mit Bootstrap-Werten meist unter 50%, statistisch allerdings nicht gut unterstützt.

Abbildung 18: Phylogenetische Beziehungen zwischen *C. albicans*-Stämmen unterschiedlicher geographischer Herkunft ermittelt mit der UPGMA-Distanz-Methode. Die statistische Relevanz der Gruppierungen wurde durch eine Bootstrap-Analyse geprüft. Nur Bootstrap-Werte höher als 50% sind in dem Dendrogramm angezeigt.



3.4 Vergleichende Untersuchung von *Candida*-Stämmen isoliert von Patientinnen mit Vaginalcandidose und ihren Partnern

3.4.1 Phänotypische Charakterisierung mit den in der Routinediagnostik angewendeten konventionellen Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden Vaginal-, Mund- und Stuhlisolate von 21 Patientinnen gynäkologischer Sprechstunden in Frankfurt/Oder sowie Isolate ihrer Partner aus Sperma, Mundhöhle und Stuhl mit den üblichen konventionellen Methoden und mit dem PCR-Fingerprinting charakterisiert. Die Ergebnisse der phänotypischen Identifizierung sind in [Tabelle 22](#) dargestellt.

Tabelle 22: Ergebnisse nach Biotypisierung mit konventionellen Methoden

Ref.	Befund bei Patientinnen					Partner		
	Vagina	Mund	Stuhl	Klinik	Vaginal-Hefen	Sperma	Mund	Stuhl
1/1	X	X	X	Vaginitis	C.alb	X		X
1/2	XX		XX	Vaginitis	C.alb	neg		X
1/3	X	X	X	Vaginitis	C.alb	neg		neg
1/4	X X			o. A.	C.alb	X		X
1/5	X X			Vaginitis	C.alb	X		X X
1/8	X		X	Vaginitis	C.alb	neg		X
7/1	X		X	Vaginitis	C.alb	neg		neg
8/1	neg		X	Vaginitis		X		neg
8/2	X			Vaginitis	C.glab	X		neg
9/1-4	X	X	X	asympt	C.alb	neg		X
9/5-8	XXX			Vaginitis	C.alb	neg	X	X
9/6	neg	X		asympt			X	
9/7	XX			o. A.	C.alb		X	X
9/11	neg		X	o. A.		neg		X
9/13	X		X	Vaginitis	C.alb	X		
9/15	X	XX		Vaginitis	C.alb	neg	neg	neg
9/17	X	X		Vaginitis	C.alb	neg	X	
9/18	X			asympt	C.alb			X
9/20	X	X		o. A.	C.alb		X	
9/21	X	X	X	asympt	C.alb	X		X
10/1	X		X	asympt	C.alb	neg	---	neg

Ref.: Patientinnen-Bezeichnung; C.alb: *Candida albicans*; C.glab: *C. glabrata*; o.A.: ohne klinische Angaben; asympt: klinisch asymptomatisch; X, XX, XXX: 1 bzw. 2 bzw. 3 Isolate.

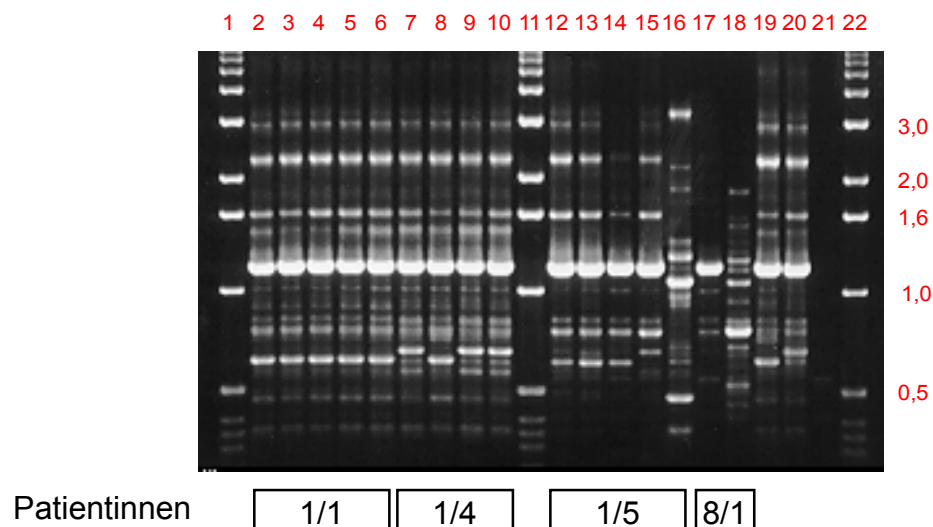
Bei 18 der 21 Patientinnen wurden Hefen aus der Vagina isoliert, 17 dieser Isolate wurden als *C. albicans* und 1 Isolat als *C. glabrata* identifiziert. Bei 12 dieser 18 Frauen wurden Hefen auch aus anderen Körperregionen isoliert. Bei 11 Frauen wurden zusätzlich Isolate aus dem Stuhl und bei 8 Frauen aus der Mundhöhle erhalten. In vier Fällen wurden sowohl aus Vagina, Stuhl und Mundhöhle Hefen isoliert, bei 5 bzw. 3 Patientinnen war die Anzucht aus Vagina und Stuhl bzw. aus Vagina und Mund positiv. Bei 2 Frauen wurden *Candida* nur im Stuhl und bei einer nur in der Mundhöhle nachgewiesen. Bei 2 Patientinnen wurde die Probenentnahme zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. Von den 21 Frauen wurden die Partner mit untersucht. Bei 17 von ihnen wurden aus mindestens einer der klinischen Proben Hefen angezüchtet, wobei bei 4 Männern aus Sperma und Stuhl und bei 3 nur aus Sperma *Candida* isoliert wurden. Bei 2 Partnern wurden Hefen im Stuhl und im Mund, bei 5 bzw. 3 Partnern wurden Hefen nur im Stuhl bzw. nur im Mund nachgewiesen.

3.4.2 Genetische Charakterisierung mit dem PCR-Fingerprinting

Mit der phänotypischen Differenzierung konnte nur eine Identifizierung der *Candida*-Isolate auf Speziesebene erreicht werden. Für die Identifizierung identischer oder ähnlicher Isolate aus unterschiedlichen Körperregionen bzw. von den Frauen und ihren Partnern wurde wieder das PCR-Fingerprinting mit Primer T3B eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Profile sind in den [Abbildungen 19 bis 24](#) zu sehen.

Bei Patientin 1/1 stimmten die Vaginal- und Stuhlisolate mit denen aus Sperma und Stuhl ihres Partners ([Abbildung 19](#), Bahnen 2 bis 6) überein. Die Vaginalisolate von Patientin 1/4 (Bahnen 9 und 10) und das Isolat aus dem Sperma ihres Partners (Bahn 7) waren identisch, während das Stuhlisolat des Partners unterschiedlich war (Bahn 8). Bei wiederholte Episoden wurden bei dieser Frau identische Vaginalisolate nachgewiesen (Bahnen 9 und 10). Bei der Patientin 1/5 (Bahnen 12 bis 16) wurden gleiche Fingerprint-Muster für die beiden Vaginalisolate und das Isolat aus Sperma gefunden. Die 2 Stuhlisolate des Partners waren untereinander unterschiedlich, eines davon war eine non-*C. albicans*-Spezies (Bahn 16). Bei der Patientin 8/1 (Bahnen 17 und 18) wurde trotz klinischer Vaginitis nur im Stuhl *C. albicans* nachgewiesen.

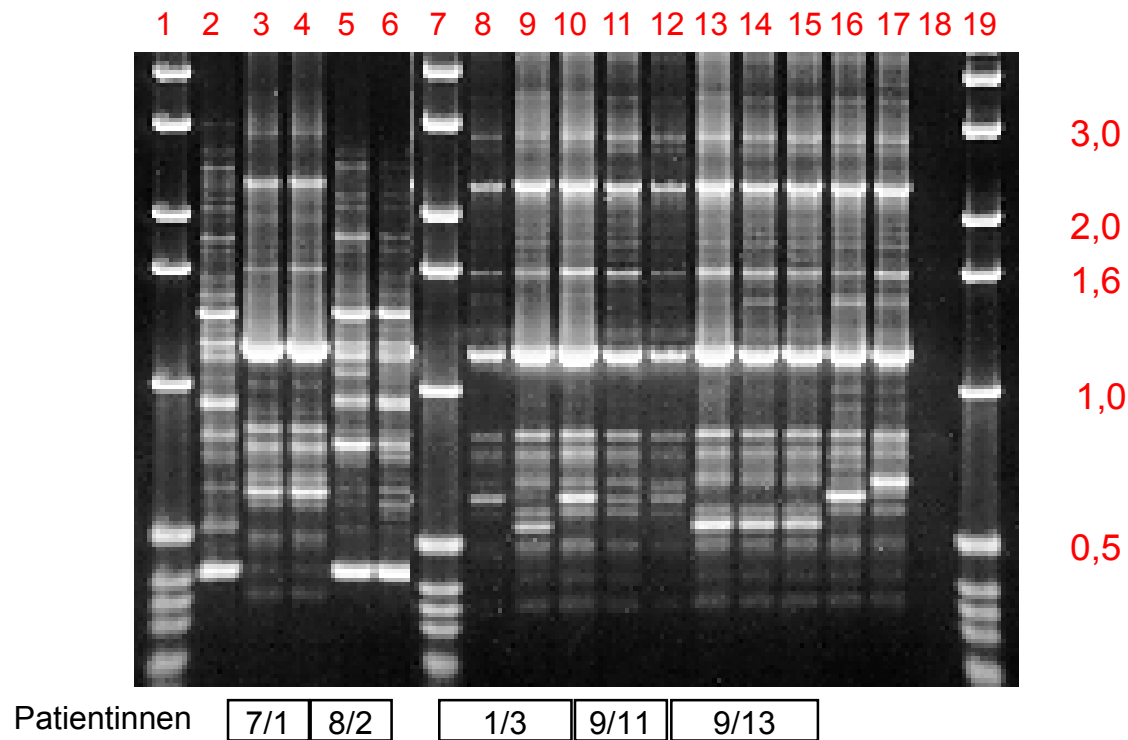
Abbildung 19: PCR-Fingerprint-Muster der *Candida*-Isolate von 4 gynäkologischen Patientinnen und ihren Partnern erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B



Bahnen / Isolate Nr.	
1, 11 und 22: 1 kb-Molekulargewichtsmarker	
2: 1/1 V	13: 1/5 V2
3: 1/1 D	14: 1/5 Sp.3
4: 1/1 M	15: 1/5 St.P.4
5: 1/1 Sp.	16: 1/5 St.P.5
6: 1/1 St.P.	17: 8/1 D
7: 1/4 Sp	18: 8/1 Sp
8: 1/4 St.P.	19: <i>C. albicans</i> Referenzstamm CBS 562
9: 1/4 V1	20: <i>C. albicans</i> Referenzstamm CBS 5983
10: 1/4 V2	21: Wasserprobe
12: 1/5 V1	

V: Vagina; D: Stuhl/Frau; M: Mund/Frau; Sp: Sperma; St.P: Stuhl/Partner.

Abbildung 20: PCR-Fingerprint-Muster der *Candida*-Isolate von 5 gynäkologischen Patientinnen und ihren Partnern erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B

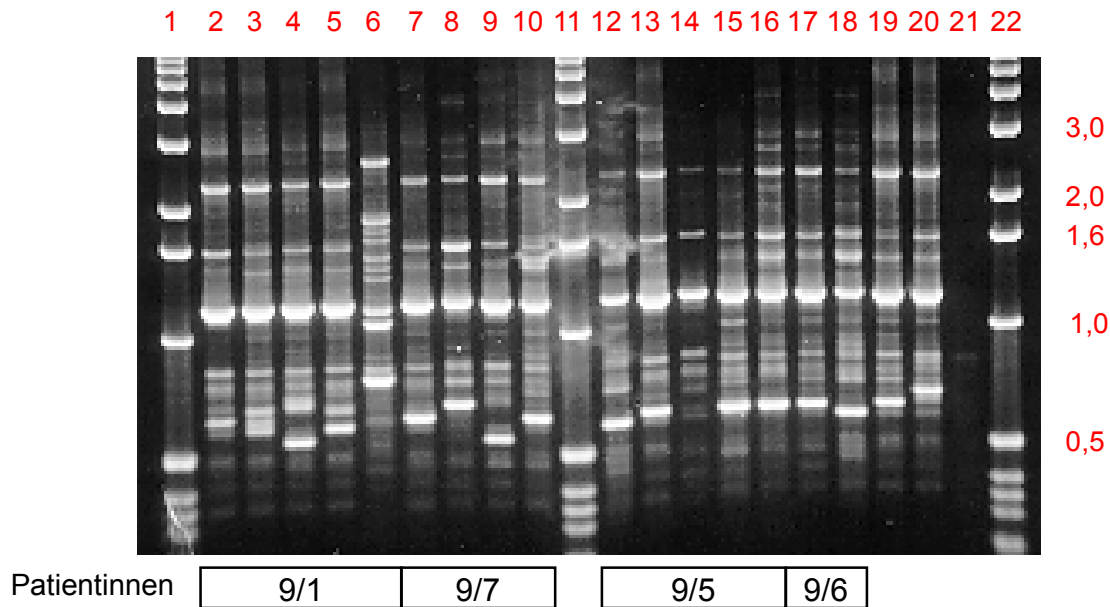


Bahnen / Isolate Nr.	
1, 7 und 19: 1 kb-Molekulargewichtsmarker	
2: <i>C. glabrata</i> Referenzstamm NCYC 350	
3: 7/1 V	12: 9/11 D
4: 7/1 D	13: 9/13 V
5: 8/2 V	14: 9/13 D
6: 8/2 Sp	15: 9/13 Sp
8: 1/3 D	16: <i>C. albicans</i> Referenzstamm CBS 562
9: 1/3 M	17: <i>C. albicans</i> Referenzstamm CBS 5983
10: 1/3 V	18: Wasserprobe 9/13 Sp
11: 9/11 St.P	

V: Vagina; D: Stuhl/Frau; M: Mund/Frau; Sp: Sperma; St.P: Stuhl/Partner.

Die Patientin 7/1 (Bahnen 3 und 4) hatte identische Vaginal- und Stuhlisolate, während beim Partner ein negativer Befund erhoben wurde. Bei der Patientin 8/2 wurden die Vaginal- und Spermaisolate als *C. glabrata* bestätigt, wobei beide ein sehr ähnliches Fingerprint-Muster aufwiesen (Bahnen 5 und 6). Bei der Patientin 1/3 zeigten die Vaginal- und Stuhlisolate identische Fingerprints, während das Isolat aus der Mundhöhle unterschiedlich war. Identische Stuhlisolate bei Frau und Partner wurden im Falle der Patientin 9/11 (Bahnen 14, 15) und gleiche Isolate aus der Vagina, dem Stuhl der Patientin 9/13 und aus dem Sperma des Partners (Bahnen 14 bis 18) nachgewiesen.

Abbildung 21: PCR-Fingerprint-Muster der *Candida*-Isolate von 4 gynäkologischen Patientinnen und ihren Partnern erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B



Bahnen / Isolate Nr.	
1, 11 und 22: 1 kb-Molekulargewichtsmarker	
2: 9/1 M	13: 9/5 V1
3: 9/1 V	14: 9/5 St.P
4: 9/1 D	15: 9/6 V2 (=9/5)
5: 9/1 St.P	16: 9/8 V3 (=9/5)
6: 9/4 V (=9/1)	17: 9/6 M
7: 9/7 V1	18: 9/6 M.P
8: 9/7 St.P	19: <i>C. albicans</i> Referenzstamm CBS 562
9: 9/7 M.P	20: <i>C. albicans</i> Referenzstamm CBS 5983
10: 9/7 V2	21: Wasserprobe
12: 9/5 MP	

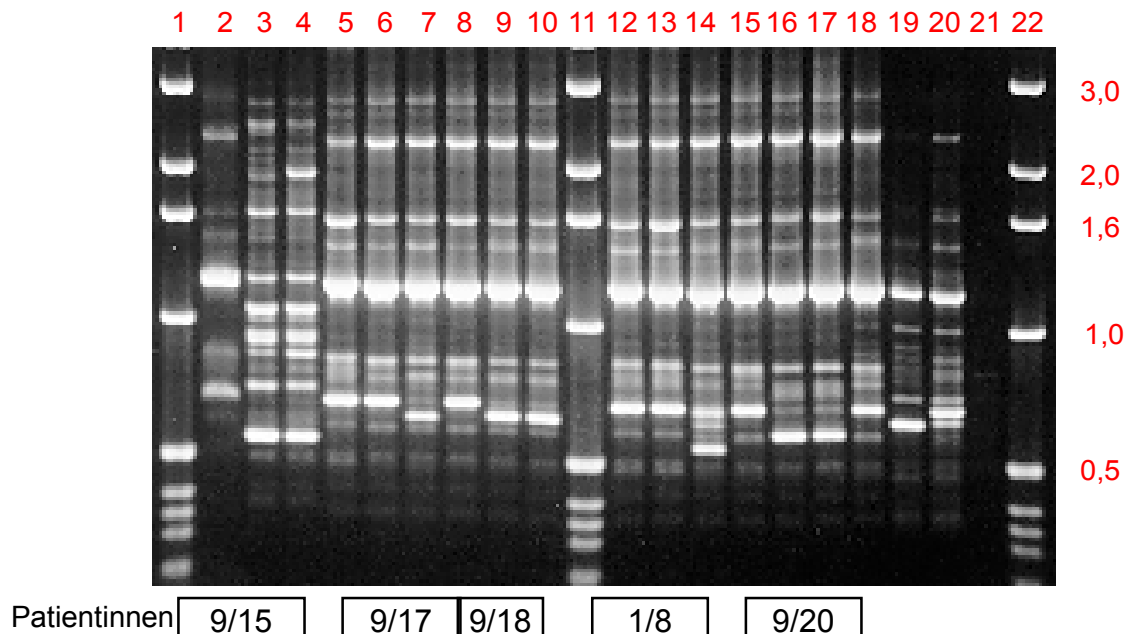
V: Vagina; D: Stuhl/Frau; M: Mund/Frau; Sp: Sperma; St.P: Stuhl/Partner; M.P: Mund/Partner.

Bei Patientin 9/1 (Bahnen 2 bis 6) zeigten alle Isolate unterschiedliche Fingerprints. Bei einer späteren Probenentnahme aus der Vagina (Bahn 6) wurde eine non-*C. albicans*-Spezies nachgewiesen, obwohl dieses Isolat mit konventionellen Methoden als *C. albicans* identifiziert wurde. Bei Patientin 9/7 waren die Fingerprints der beiden Vaginalisolate (Bahnen 7 und 10) sehr ähnlich. Die Partnerisolate (Bahnen 8 und 9) unterschieden sich sowohl untereinander als auch von denen der Frau.

Zwei zu verschiedenen Zeitpunkten bei Patientin 9/5 isolierte Vaginalisolate (Bahnen 13 und 16) hatten identische PCR-Profile. Ein drittes Isolat (Bahn 15) hatte einen sehr ähnlichen Fingerprint. Die Partnerisolate differierten sowohl untereinander als auch im Ver-

gleich zu denen der Frau. Patientin 9/6 (Bahnen 17-18) war ohne klinische Symptome. Es konnte nur aus der Mundhöhle, aber nicht aus der Vagina, ein *Candida*-Isolat angezüchtet werden. Dieses unterschied sich vom Mundhöhlenisolat ihres Partners.

Abbildung 22: PCR-Fingerprint-Muster der *Candida*-Isolate von 7 gynäkologischen Patientinnen und ihren Partnern erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B



Bahnen / Isolate Nr.	
1, 11 und 22: 1 kb-Molekulargewichtsmarker	
2: 9/15 V	13: 1/8 D
3: 9/15 M1	14: 1/8 St.P
4: 9/15 M2	15: 9/19 V
5: 9/16 V	16: 9/20 V
6: 9/17 V	17: 9/20 M
7: 9/17 M	18: 9/20 M.P
8: 9/17 M.P	19: <i>C. albicans</i> Referenzstamm CBS 562
9: 9/18 V	20: <i>C. albicans</i> Referenzstamm CBS 5983
10: 9/18 St.P	21: Wasserprobe
12: 1/8 V	

V: Vagina; D: Stuhl/Frau; M: Mund/Frau; Sp: Sperma; St.P: Stuhl/Partner; M.P: Mund/Partner.

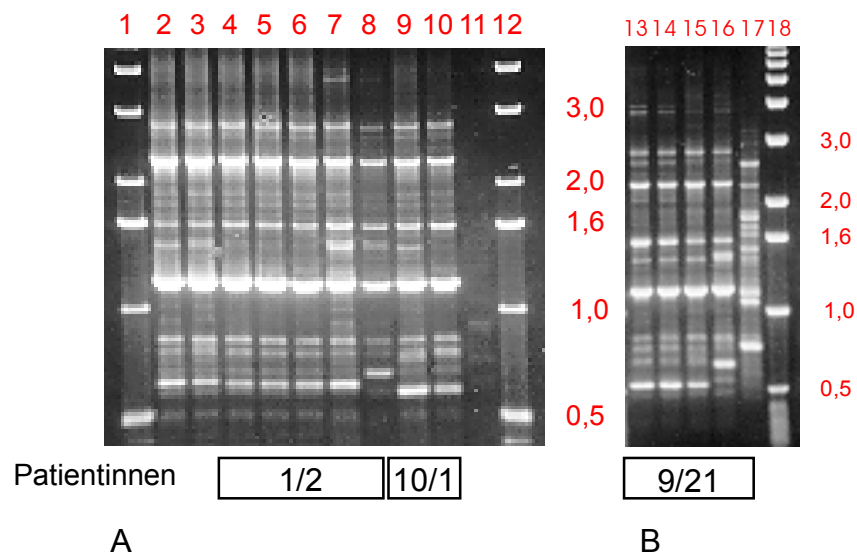
Bei Patientin 9/15 wurde in der Vagina *C. albicans* nachgewiesen (Bahn 2). Aus der Mundhöhle wurden 2 phänotypisch unterschiedliche, genotypisch aber identische *C. famata*-Isolate (Bahnen 3 bis 4) nachgewiesen. Aus den 3 Proben vom Partner wurden keine Hefen isoliert. Bei den Patientinnen 9/16 und 9/19 (Bahnen 5 und 15) waren bis auf das Vaginalisolat alle Proben negativ. Eine erneute Probenentnahme konnte bisher

noch nicht erfolgen. Bei Patientin 9/17 wurden identische Isolate in der Vagina und der Mundhöhle des Partners nachgewiesen (Bahnen 6 und 8), die sich jedoch von dem Mundhöhlenisolat der Frau unterschieden. Bei Patientin 9/18 stimmten die PCR-Fingerprints ihres Vaginalisolats und des Stuhlisolats ihres Partners überein (Bahnen 9-10). Bei Patientin 1/8 waren die Isolate der Frau (Vagina und Stuhl, Bahnen 12-13) identisch, differierten jedoch vom Stuhlisolats ihres Partners in Bahn 14. Patientin 9/20 hatten die Isolate der Frau (Vagina und Mund, Bahnen 16-17) gleiche das Isolat aus der Mundhöhle ihres Partners (Bahn 18) aber unterschiedliche Fingerprint-Muster.

Bei der Patientin 1/2 ([Abbildung 23](#) Bahnen 4 bis 8) stimmten die Vaginal- und Stuhlisolate mit dem Isolat aus dem Stuhl ihres Partners überein. Bei einer späteren Untersuchung wurden aus der Vagina und dem Stuhl der Patientin unterschiedliche Isolate nachgewiesen, ohne Beziehung zu den früher isolierten Stämmen. Bei Patientin 10/1 stimmten die Isolate aus der Vagina und dem Stuhl (Bahnen 9-10) überein. Die Isolate der Patientin 9/21 hatten identische Fingerprint-Muster (Bahnen 13 bis 15) während beim Partner (Bahnen 16-17) für das Stuhlisolat ein anderer *C. albicans*-Genotyp und im Sperma eine non-*C. albicans*-Spezies (*C. lusitaniae*) nachgewiesen wurde.

Die Ergebnisse der Stammvergleiche mit dem PCR-Fingerprinting für die einzelnen Patientinnen sind in [Tabelle 23](#) dargestellt.

Abbildung 23: PCR-Fingerprint-Muster der *Candida*-Isolate von 3 gynäkologischen Patientinnen und ihren Partnern erhalten durch Amplifizierung mit Primer T3B



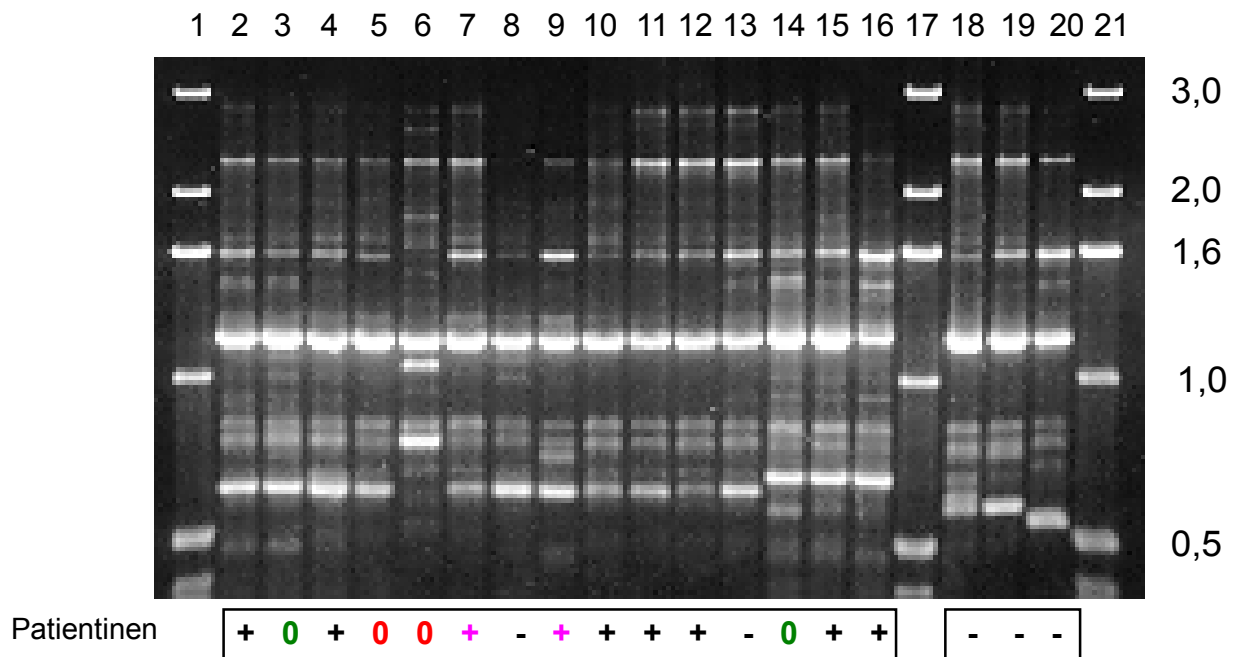
Bahnen / Isolate Nr.	
1, 12 und 18: 1 kb-Molekulargewichtsmarker	
2:	<i>C. albicans</i> Referenzstamm CBS 562
3:	<i>C. albicans</i> Referenzstamm CBS 5983
4:	1/2 D 11: Wasserprobe
5:	1/2 St.P 13: 9/21 V
6:	1/2 V 14: 9/21 D
7:	1/2 (5702 V) 15: 9/21 M
8:	1/2 (5702 D) 16: 9/21 St.P
9:	10/1 V 17: 9/21 Sp
10:	10/1 D

V: Vagina; D: Stuhl/Frau; M: Mund/Frau; Sp: Sperma; St.P: Stuhl/Partner.

Tabelle 23: Ergebnisse des PCR-Fingerprinting für die von gynäkologischen Patientinnen und ihren Partnern isolierten *Candida*-Stämme

Gruppen / Eigenschaft	Patienten-Nr. / Merkmale
A Identische Isolate aus verschiedenen Körperregionen (8x)	1/1 Vagina = Stuhl 1/2 Vagina = Stuhl 1/8 Vagina = Stuhl 7/1 Vagina = Stuhl 9/13 Vagina = Stuhl 9/20 Vagina = Mund 9/21 Vagina = Stuhl = Mund 10/1 Vagina = Stuhl
B Keine Identische Isolate aus verschiedenen Körperregionen (4x)	1/3 Vagina = Stuhl \neq Mund 9/1 Vagina1 \neq 2 \neq Stuhl \neq Mund 9/15 Vagina \neq Mund 9/17 Vagina \neq Mund
C Identische Fingerprint-Muster bei beiden Partnern (9x)	Frau = Partner 1/1 Vaginal = Sperma/Stuhl (1x) 1/4 Vaginal = Sperma (3x) 1/5 " " 8/2 " " 1/2 Vaginal = Stuhl (3x) 9/13 " " 9/18 " " 9/17 Vaginal = Mund (1x) 9/11 Stuhl = Stuhl (1x)
D Keine identische Isolate bei beiden Partnern (7x)	1/8 8/1 9/1-9/4 9/5 9/6 9/7 9/21
E Wiederholte Proben bzw. mehrfache Isolate (5x)	1/2 Vaginal/Stuhl unterschiedlich 9/5 Vaginal 1 & 3 identisch

Abbildung 24: Vergleich der von den Vaginalisolaten verschiedener Patientinnen erhaltenen PCR-Fingerprint-Muster (Primer T3B)



Bahnen / Isolate Nr.		
1, 17 und 21: 1 kb-Molekulargewichtsmarker		
2: 1/1 V	8: 9/6 V	14: 1/4 V1
3: 1/4 V2	9: 9/8 V	15: 9/17 V
4: 1/5 V2	10: 7/1 V	16: 1/8 V
5: 9/7 V1	11: 1/2 V1	18: 9/1 V
6: 9/7 V	12: 1/3 V1	19: 10/1 V
7: 9/5 V	13: 9/18 V	20: 9/21 V
+: klinische Vaginitis; -: asymptotisch; 0: ohne klinische Daten		

Durch einen Vergleich der 18 Vaginalisolate von 15 Frauen (von 3 Frauen wurden jeweils 2 Stämme in die Analyse einbezogen) wollten wir überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen den Besiedlungsstämmen bei nicht klinisch erkrankten Frauen und den Infektionsstämmen von klinisch erkrankten Frauen gibt ([Abbildung 24](#)). Von den 18 Isolaten stammten 9 von Frauen, die klinisch an einer Vaginitis erkrankt waren (+), und 4 von Frauen ohne Beschwerden (0). Zu den verbleibenden 5 Frauen (-) konnten wir keine Angaben erhalten. Obwohl für 11 der Isolate sehr ähnliche bis identische Fingerprint-Muster nachgewiesen wurden (Bahnen 1-5 und 7-13), ließ sich keine Korrelation zwischen bestimmten Genotypen und der unterschiedlichen klinischen Symptomatik feststellen.

4 DISKUSSION

Mit steigender Häufigkeit werden Vertreter der Gattung *Candida* als Ursache nosokomialer Infektionen, besonders bei Patienten mit defizitärer Infektabwehr, nachgewiesen. Dabei reicht das Spektrum der Erkrankungen von Infektionen der Haut und der Schleimhäute bis hin zu schweren systemischen Mykosen bei immunsupprimierten Patienten. *Candida albicans* ist der am meisten isolierte Erreger derartiger Pilzinfektionen. Außerdem spielen *Candida*-Arten als Infektionserreger eine herausragende Rolle in der Dermatologie (Dermatomykosen aller Art), in der Gynäkologie (Problem der chronisch rezidivierenden Vaginalcandidose) und in der Pädiatrie. Die verschiedenen medizinisch relevanten *Candida*-Arten unterscheiden sich in ihrer Pathogenität und auch in ihrem Resistenzverhalten gegenüber gebräuchlichen Antimykotika (Nguyen et al. 1996). Das Problem der Speziesidentifizierung in der mykologischen Labordiagnostik ist deshalb sowohl klinisch als auch epidemiologisch (Erregerwandel) und wirtschaftlich (Einsatz von Breitbandantimykotika bei unsicherer Identifizierung) relevant.

4.1 Identifizierung konventionell schwer differenzierbarer *Candida*-Stämme mit molekularbiologischen Methoden

4.1.1 Differenzierung von *C. guilliermondii* / *C. famata*-Isolaten von dermatologischen Patienten

Candida guilliermondii ist seit langem als seltener Erreger von septischen Arthritiden oder Endokarditiden vor allem bei IV-Drogenabhängigen, aber auch bei immunsupprimierten und chirurgischen Patienten, bekannt. Dieser Erreger kann jedoch auch als Kommensale auf der Haut gesunder Menschen und in Tierprodukten, wie z.B. in Kuhmilch, vorkommen (Lagneau et al., 1996, Rinaldi, 1993, Rippon, 1982). Als Standortflora in der Vagina spielt *C. guilliermondii* allerdings keine Rolle. In Sri Lanka wurde *C. guilliermondii* nur bei 1/140 Fällen in Vaginalabstrichen von symptomatischen Frauen mit Vulvovaginitis und in keinem Fall bei asymptomatischen Frauen nachgewiesen (Perera & Clayton 1994). In der Schweiz fand Bregenzer (1996) *C. guilliermondii* bei 2% der Candidasepsis-Fälle in einer 6-jährigen retrospektiven Studie.

In der Dermatologischen Klinik der Universitätsklinik Charité Berlin, wurden von 1992 bis 1995 131 *Candida guilliermondii*-Stämme erfaßt. Die Speziesidentifizierung basierte

auf den Ergebnissen der routinemäßig angewendeten konventionellen Methoden und der klinischen Manifestation der Erkrankung. Damit nahmen *C. guilliermondii* die dritte Stelle bei den candidabedingten Dermatomykosen nach *C. parapsilosis* und *C. albicans* ein. Von den insgesamt 5,9% der durch Hefen verursachten Hautmykosen wurden 1,8% durch diesen Erreger hervorgerufen.

Candida famata wurde ursprünglich in Japan aus der Luft ([Saito, 1922](#)) isoliert und als „*Torula candida*“ beschrieben. Seitdem wurden diese Hefen auch aus Lebensmitteln, einschließlich Obst und vergorenen Produkten, aus verschiedenen tierischen Quellen und gelegentlich aus klinischen Proben wie Haut und Schleimhaut isoliert. Bisher wurden Stämme von *C. famata* meist nur als Kontaminanten angesehen, obwohl es inzwischen Berichte über ihre potentielle Pathogenität bei immunsupprimierten Patienten gibt ([Quindos 1994](#)) und die Pathogenität auch im Tiermodell nachgewiesen werden konnte ([Nishikawa et al. 1996](#)). Der erste Fall einer intravenösen katheterassoziierten Fungämie durch *C. famata* wurde bei einem knochenmarkstransplantierten Patienten ([St-Germain & Laverdière 1986](#)) beobachtet.

Schwierigkeiten treten bei der Differenzierung zwischen *C. guilliermondii* und *C. famata*-Isolaten häufig auf ([Odds et al. 1997](#), [Kitch et al. 1996](#), [Quindos 1994](#), [Mendling 1993](#)). [Odds et al.](#) berichteten 1997, daß die Identifizierung von Hefen vorwiegend mit kommerziell erhältlichen Kits Probleme bereiten kann, und daß beispielsweise bei der Differenzierung der Spezies *C. guilliermondii* und der Spezies *C. famata* Irrtümer oft schwer zu vermeiden sind. Diese beiden Spezies ähneln sich in vielen morphologischen und physiologischen Eigenschaften. Eine erfolgreiche phänotypische Diskriminierung zwischen diesen beiden Spezies ist durch den Nachweis der Pseudohyphenbildung bei *C. guilliermondii* möglich. Dieses für *C. guilliermondii* normalerweise typische Merkmal wird aber manchmal nicht ausgeprägt ([Odds et al. 1997](#), [McGinnis et al. 1984](#)), so daß die Differenzierung zwischen den beiden Spezies nicht immer gelingt. In einer Studie zur Klärung der taxonomischen Stellung klinischer Isolate von *C. famata*, bei der einerseits phänotypische Merkmale aber auch die DNA/DNA-Reassoziationsuntersuchung untersucht wurden, konnten nur 3 von 5 klinischen *C. famata*-Stämmen aus der Sammlung der Fa. bioMérieux als *C. famata* bestätigt werden ([Nishikawa et al. 1996](#)). Die übrigen 2 Isolate wurden als *C. guilliermondii* / *C. famata* bezeichnet, obwohl keiner der 5 Stämme Pseudomyzelien gebildet hatte. Eine häufige Verwechslung der phänotypisch ähnlichen Arten *C. famata* und *C. guilliermondii* bei einer Identifizierung mit dem System Api 20 Au-

xonogramm sowie durch Anzucht auf Reisagar wurde auch von [Mendling \(1993\)](#) beschrieben.

Differentialnährmedien wie der ALBICANS ID-Agar oder die CHROM-Agar-Platten sind nicht in der Lage zwischen *C. guilliermondii* und *C. famata* zu diskriminieren, weil deren Kolonien die gleiche Färbung aufweisen ([San-Milán et al. 1996](#)).

Früher wurden die *Candida*-Hefen zwei unterschiedlichen Gattungen, *Candida* und *Torulopsis*, zugeordnet, die durch die Fähigkeit (*Candida*) bzw. die Unfähigkeit (*Torulopsis*) unter den entsprechenden Bedingungen Pseudohyphen zu bilden gekennzeichnet waren. Diese Trennung konnte sich jedoch nicht durchsetzen, weil sie nicht durch molekulare Untersuchungen gestützt werden konnte, so daß alle *Candida* und *Torulopsis*-Arten wieder in der Gattung *Candida* vereint wurden ([Yarrow & Meyer 1978](#)), obwohl diese Fusion immer starke Gegner hatte ([McGinnis et al. 1984](#)). [Odds \(1997\)](#) unterstützte die Zusammenfassung von *Candida* und *Torulopsis*, da er zeigen konnte, daß unabhängige Beobachter diese Eigenschaft bei den gleichen Isolaten unterschiedlich bewerteten. Die Pseudohyphenbildung stellt somit ein zu unzuverlässiges Kriterium für die Zuordnung der Hefen zu zwei unterschiedlichen Gattungen dar. Für die Differenzierung einiger Spezies jedoch, wie z.B. von *C. guilliermondii* und *C. famata* ist die Pseudohyphenbildung die einzige akzeptable unterschiedliche phänotypische Eigenschaft.

Die Identifizierung von *C. guilliermondii* stellt gegenwärtig ein wichtiges Problem bei der Diagnostik von Dermatomykosen dar. Mit beiden molekularbiologischen Methoden konnten von den 37 fraglichen Stämmen 31 als *C. guilliermondii* und 3 als *C. famata* identifiziert werden. Mit der Biochemotypie gelang nur der Nachweis eines der drei *C. famata*-Isolate und von 23 der 31 *C. guilliermondii* - Isolate (74%). 24 Isolate wurden mit den konventionellen Methoden gar nicht oder falsch identifiziert. Als besonderes Problem muß dabei die fehlende bzw. fragliche Pseudomyzelbildung bei fast allen untersuchten Stämmen genannt werden. Diese Eigenschaft hat sich in unserem Stammgut als unzureichendes Kriterium für die Diskriminierung von *C. guilliermondii* und *C. famata* erwiesen. Drei Stämme konnten auch mit molekularbiologischen Methoden wegen fehlender Referenzstämmen nicht identifiziert werden, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß es bei diesen Isolaten um Stammkontaminationen handelt. [Kitch et al. \(1996\)](#) konnten bei der Evaluierung einer qualitativen Mikromethode (RapID Yeast Plus system), welche konventionelle und chromogene Substrate für eine schnelle Identifizierung medizinisch relevanter Hefen verwendet, zum Beispiel auch zeigen, daß ein *Can-*

didia utilis-Stamm als *C. famata*/ *C. guilliermondii* falsch identifiziert wurde.

Die beiden in dieser Arbeit angewendeten molekularbiologischen Identifizierungsverfahren weisen unterschiedliche Abschnitte in der genomischen DNA von *Candida* nach. Beim PCR-Fingerprinting werden über das gesamte Genom verteilte DNA-Abschnitte mit unspezifischen Primern amplifiziert (Welsh et al. 1992), die Restriktionsanalyse der ITS-Region weist dagegen Polymorphismen in den hochvariablen intergenischen Spacern der ribosomalen Operone nach.

Sowohl das PCR-Fingerprinting als auch die RFLP-Analyse der ITS-Regionen haben stets zu eindeutigen und übereinstimmenden Ergebnissen bei der Diskriminierung der Spezies *C. guilliermondii* und *C. famata* geführt. Der Nachteil des PCR-Fingerprinting ist, daß diese Technik nur mit Reinkulturen durchgeführt werden kann, weil die verwendeten unspezifischen Primer auch humane oder tierische DNA sowie die DNA kontaminierender Mikroorganismen amplifizieren würden. Die ITS-PCR konnte bereits direkt aus Einzelkolonien durchgeführt werden (Nho et al., 1997), die Amplifizierung direkt aus klinischen Materialien ohne vorherige Anzucht erscheint prinzipiell möglich.

Bei der Sequenzierung eines Teils des „Internal Transcribed Spacers“ (ITS2) im ribosomalen Operon von 7 *C. famata*- bzw. *Debaryomyces hansenii*-Stämmen (Teleomorph von *C. famata*) aus der Stammsammlung des ATCC zeigten alle Stämme Sequenzunterschiede in dieser Region, was darauf hinweist, daß es sich bei *C. famata* möglicherweise eher um einen taxonomischen Komplex von mehr als einer Spezies handelt (Elie et al. 1998). Mit der in unserem Labor angewandten RFLP-Analyse der ITS-Region konnten wir keine Stammunterschiede feststellen, was darauf zurückzuführen sein könnte, daß die Sequenzunterschiede nicht die Schnittstellen der Restriktionsenzyme betrafen und auch nicht zu nachweisbaren Unterschieden in der Größe der erhaltenen Fragmente führten.

Es gibt eine große und weiter zunehmende Anzahl an Präparaten für die Therapie von Dermatomykosen in den verschiedensten Darreichungsformen. Für die lokale Anwendung haben sich zahlreiche Antimykotika unterschiedlicher chemischer Klassen (Azole, Allylamine, Tolnaftate, Tolzilate, Amorolfine, Ciclopirox, etc.) durchgesetzt. Alle diese Präparate zeigen bei einer hohen Wirksamkeit nur selten unerwünschte Nebenwirkungen. Bei einer systemischen Therapie der Dermatomykose ist die Auswahl der Mittel kleiner. Drei Wirkstoffe genießen hier eine große Wertschätzung: Fluconazol, Itracona-

zol (Triazol) und Terbinafin (Allylamin). Letzteres gilt als das wirksamste Mittel zur Therapie von Infektionen, die durch Dermatophyten hervorgerufen werden. Dermatophytenspezifisch wirkt auch Griseofulvin, das erste systemische Antimykotikum überhaupt. Fluconazol ist ein Präparat, das hochwirksam gegen Hefen ist, sich aber in der Therapie von Dermatomykosen noch nicht durchgesetzt hat.

In den diagnostischen Laboratorien werden Resistenztestungen bei Hefen noch nicht routinemäßig eingesetzt. Verschiedene Autoren haben jedoch eine erhöhte Resistenz von *C. guilliermondii* gegenüber Antimykotika beschrieben ([Tietz and Czaika 1999](#), [Dick 1985](#)). Deshalb wäre nach einer korrekten Identifizierung von therapierefraktären *C. guilliermondii* eine systemische Therapie sinnlos und es müßte in diesen Fällen eine Lokalthherapie empfohlen werden. Da bisher keine resistente *C. famata*-Isolate beschrieben wurden, könnte bei der Diagnose von *C. famata* ohne Resistenztestung eine systemische Therapie eingesetzt werden.

4.1.2 Identifizierung von *Candida albicans*-Stämmen mit atypischen morphologischen und biochemischen Eigenschaften

Ein großer Vorteil molekularbiologischer Techniken ist, daß sie eine Speziesidentifizierung auch bei Isolaten mit atypischer Morphologie, mit veränderten Wachstumseigenschaften und abweichender Biochemotypie gestatten. Andererseits können auch phänotypisch identische Stämme mit diesen Methoden unterschieden werden. Schon 1993 wurde von [Jitsurong et al.](#) im Zusammenhang mit der Evaluierung eines neuen milchhaltigen Mediums für die Keimschlauch- und Chlamydosporenbildung bei *C. albicans* über Chlamydosporen-negative *Candida albicans*-Stämme berichtet. Eine weitere Charakterisierung dieser Stämme wurde jedoch nicht durchgeführt.

Von unserer Gruppe konnten vaginale *Candida*-Isolate aus Südost- und Südwestafrika, die nicht in der Lage waren, Glukosamin und N-Acetylglukosamin zu verwerten und auf Reisagar Chlamydosporen zu bilden und deshalb in der Biochemotypie (ID 32C, bioMérieux V. 1) als *C. sake* fehlinterpretiert worden waren (Identifizierungscode 7042 3400), mit dem PCR-Fingerprinting eindeutig als *C. albicans*-Stämme identifiziert werden ([Tietz et al. 1995](#)). Ähnliche Stämme wurden auch in Deutschland aus der Mundhöhle HIV-Infizierter isoliert. Auch hier wurden 5 biochemisch als *C. sake* identifizierte Stämme im PCR Fingerprinting als *C. albicans* bestimmt ([Hoegl et al. 1998](#)). Die von unserer Ar-

beitsgruppe und von anderen Autoren beschriebenen Probleme bei der biochemischen Identifizierung atypischer *Candida*-Isolate wurden in der kürzlich vom Hersteller herausgegeben Version 2 des API-Systems ID 32C berücksichtigt.

Eine inzwischen in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte populationsgenetische Untersuchung der atypischen *C. albicans*-Stämme mit gleichen biochemischen Eigenschaften hat ergeben, daß diese einen besonderen Klon darstellen und sich deutlich von Populationen mit normalem Biotyp aus Afrika unterscheiden (Forche 1999).

Seit Beginn dieses Jahrzehnts mehren sich Berichte über atypische *Candida*-Stämme, die von immunsupprimierten Patienten, vor allem aus der Mundhöhle von HIV-Infizierten bzw. AIDS-Patienten, isoliert wurden (Pujol et al. 1997, McCullough et al. 1995, Sullivan et al. 1993). Einige dieser Isolate zeichneten sich durch eine phänotypische Ähnlichkeit mit *C. albicans* aus, wiesen aber auch eine Reihe von Unterschieden auf (Tabelle 24), die ihre Identifizierung in dem API-System erschwerten (Sullivan and Coleman 1998, Salkin et al. 1998). Diese Isolate wuchsen auf CHROMagar als dunkelgrüne Kolonien (*C. albicans*: blaugrün), zeigten aber im Gegenteil zu *C. albicans* kein Wachstum bei 45° C (Pinjon et al. 1998).

Tabelle 24: Zusammenfassung der Daten der biochemischen Charakterisierung der Biotypen 1 und 2 von *C. albicans* sowie der atypischen Stämme aus der Mundhöhle HIV-Infizierter anhand der Prozentualtabelle der BioMerieux Datenbank (Salkin et al. 1998).

Stämme	Substrat	
	MDG*	XYL**
Biotyp 1	98%	98%
Biotyp 2	0%	67%
atypische	0%	0%

* alpha-Methyl-D-Glucoside; **D-XYLose

Die genetische Analyse dieser atypischen *Candida*-Isolate mittels MLEE, mittels DNA-Fingerprinting mit der für *C. albicans*-spezifischen 27A-Sonde sowie mit verschiedenen „simple repeat“-Sonden, mittels PCR-Fingerprinting mit kurzen Zufallsprimern (RAPD-Technik), mittels Karyotyp-Analyse und rDNA-Sequenzierung zeigte deutliche Unterschiede in der Organisation ihres Genoms im Vergleich zu *C. albicans* und *C. stellato-*

dea. Sequenzvergleiche einer variablen Region (V3) im *Isu* rRNA-Gen ergab, daß sich die atypischen Isolate von allen anderen getesteten *Candida*-Spezies unterschieden, wobei sie allerdings am stärksten zu *C. albicans* verwandt waren. Die genetischen wie auch die phänotypischen Charakteristika der atypischen Isolate unterstützten somit ihre Zuordnung zu einer neuen Spezies *C. dubliniensis* (Sullivan et al. 1995). Inzwischen wird weltweit über das Vorkommen dieser atypischen Isolate berichtet (Sullivan et al. 1997, Boerlin et al. 1995b, McCullough et al. 1995). Auch der ehemalige *C. stellatoidea*-Referenzstamm „NCPF 3108“ der „British National Collection of Pathogenic Fungi“ wurde als *C. dubliniensis* identifiziert (Sullivan and Coleman 1998).

In Zusammenarbeit mit unserer Gruppe wurde eine biochemisch nicht typisierbare rot-pigmentierte Variante von *C. albicans* (Kerkmann et al. 1999) beschrieben, die durch verschiedene molekularbiologische Methoden wie das PCR-Fingerprinting mit dem Primer T3B und die Analyse der 18S rRNA-Gen-Sequenz identifiziert wurde. Dieses Isolat, welches wegen seiner ungewöhnlichen bräunlichen Färbung auffiel, stammte von einem an zystischer Fibrose erkrankten Patienten, von dem bereits eine chronische Besiedlung mit *Pseudomonas* spp. bekannt war. Weitere Untersuchungen haben für diesen Stamm eine Primärresistenz gegenüber Flucytosin (MHK > 32 µg/ml) ergeben. Es besteht die Gefahr, daß eine derartige „rotpigmentierte Hefe“, möglicherweise als „*Rhodotorula* spp.“ bezeichnet wird und somit als nicht therapiebedürftiges Isolat gilt. Ähnliche Probleme können auch mit anderen als „unidentifizierbar“ bezeichneten Isolaten auftreten.

Die in dieser Arbeit analysierten atypischen Stämme, mit Ausnahme eines 2KG-negativen Isolats (Abbildung 15, Bahn 2), konnten nicht als neue *Candida*-Spezies identifiziert werden. Mit dem PCR-Fingerprinting konnten keine wesentlichen Unterschiede zu *C. albicans* festgestellt werden, während *C. dubliniensis*-Isolate unter den gleichen Bedingungen distinkte PCR-Profile aufwiesen. Forche (1998) konnte durch die Sequenzierung einer variablen Region des *Isu* rRNA-Gens (D1/D2) eindeutig nachweisen, daß sich sowohl die von uns getesteten typischen als auch die atypischen *C. albicans*-Stämme innerhalb der *C. albicans*-Gruppe einordnen. Kurtzman & Robnett (1997) konnten mit dem gleichen Verfahren nachweisen, daß die phänotypische Variabilität bei Isolaten derselben Spezies sehr ausgeprägt sein kann. Unsere atypischen Isolate ließen sich klar von der am engsten verwandten Spezies, *C. dubliniensis*, abgrenzen und stellen vermutlich eher eine Mutante oder eine spezielle Untergruppe von *Candida albicans*

dar.

Als Beispiele für *C. albicans*-Mutanten bzw. -Varianten können *C. stellatoidea* Typ I und II aufgeführt werden, die zunächst als separate *Candida*-Spezies klassifiziert wurden. Untersuchungen zu ihrer Genetik und ihrer Virulenz ([Kwon-Chung et al. 1990](#), [Kwon-Chung et al. 1989](#)) haben gezeigt, daß *C. stellatoidea* Typ II eine stabile Saccharose-negative Mutante von *C. albicans* ist, während *C. stellatoidea* Typ I aufgrund gravierender Abweichungen z.B. im Karyotyp, in der mitochondrialen DNA und in der RFLP-Analyse als Variante von *C. albicans* charakterisiert wurde ([Kwon-Chung & Bennett 1992](#)).

4.2 Vergleichende genotypische Charakterisierung von *C.albicans*-Vaginalisolaten aus Afrika und Europa

Mit verschiedenen molekularen Typisierungsmethoden wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Genotypen bei verschiedenen *C. albicans*-Stämmen nachgewiesen. [Clemons et al. 1991](#), [Schmid et al. 1990](#), [Magee et al. 1987](#) und [Scherer & Stevens 1987](#) setzten für diesen Zweck eine RFLP- Analyse ein. [Hoegl et al. 1998](#), [Niesters et al. 1993](#), [Schönian et al. 1993a-b](#) und [Lehmann et al. 1992](#) nutzten die RAPD-Technik bzw. eine ähnliche PCR-Fingerprint-Technik, während [Bostock et al. 1993](#) und [Magee et al. 1992](#) RAPD, PFGE und RFLP verglichen. Die relativ kostengünstige RFLP-Analyse ist erst nach Hybridisierung mit spezifischen und repetitiven DNA-Sonden aussagekräftig und hat den Nachteil, daß sie große Mengen DNA benötigt. Die Karyotypie mit der PFGE und die RAPD haben eine bessere Diskriminierungsstärke, sind aber kosten- und zumindest die PFGE, auch zeitaufwendiger. Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Methoden kam [Bostock \(1993\)](#) zu dem Schluß, daß zukünftig die RAPD wahrscheinlich für große epidemiologische Studien bei *C. albicans* die Methode der Wahl sein wird. [Lehmann et al. \(1992\)](#) haben die RAPD-Methode (PCR-Fingerprinting) verwendet, um die genetische Verwandtschaft zwischen medizinisch relevanten Stämmen der Gattung *Candida* zu ermitteln. Sie erhielten „distinktive“ und reproduzierbare Sets von PCR-Produkten für verschiedene *Candida*-Spezies und konnten mit ihrer RAPD-Technik Intraspezies-DNA-Polymorphismen bei Isolaten verschiedener *Candida*-Spezies nachweisen. Sie waren z.B. in der Lage, 3 unterschiedliche Gruppen von *C. parapsilosis* zu differenzieren.

[Schmid et al. 1990](#) entwickelten eine computergestützte Methode (Dendron) zur Spei-

cherung von DNA-Fingerprint-Mustern in „data files“. Die Berechnung der Similaritätskoeffizienten zwischen Isolaten erfolgt je nach Stärke und Verteilung der Banden und gestattet die Darstellung der Beziehungen zwischen den Stämmen bzw. von Untergruppen von Stämmen bei großen epidemiologischen Studien.

[Kurtzman \(1997\)](#) konnte bei der Sequenzanalyse der variablen (D1/D2)-Region am 5' Ende des *lsu* (26S) rRNA-Gens zeigen, daß Mitglieder einer Spezies nicht mehr als 0 bis 2 Nukleotidaustausche in dieser Region aufweisen, so daß diese Methode nicht in der Lage war, Stammvariationen innerhalb einer Spezies nachzuweisen. Unterschiedliche, auch selten gefundene *Candida*-Spezies wiesen in dieser Region 6 bis 49 Sequenzunterschiede auf.

Die meisten dieser Untersuchungen führten zu der Schlußfolgerung daß die zur normalen Besiedlungsflora gehörenden *Candida albicans*-Stämme die Quelle nachfolgender Infektionen sind und daß alle oder die meisten der kommensalen Stämme in der Lage sind, klinische Symptome hervorzurufen. Es gibt jedoch auch Hinweise auf einen möglichen Stammaustausch beim Übergang zur Infektion ([Schmid et al. 1993](#)).

[Pfaller et al. \(1998\)](#) haben mittels DNA-Fingerprinting unter Verwendung der spezies-spezifischen Ca3-Sonde und eines computergestützten Auswertungssystems die Verwandtschaft von 162 *Candida albicans*-Stämmen analysiert, die in den USA bei hämatogenen Infektionen isoliert wurden. Sie fanden, daß besondere Stämme in bestimmten geographischen Regionen konzentriert sind. Derartige „etablierte Stämme“ kommen in einigen aber nicht in allen Krankenhäusern endemisch vor und werden vorwiegend bei den dort hospitalisierten Patienten gefunden. In diese Studie wurden auch Fluconazol-resistente Stämme einbezogen; es konnte jedoch keine enge Verwandtschaft zwischen den Fluconazol-resistenten Stämmen und aus dem Blut isolierten Stämmen, weder vom gleichen geographischen Ort noch vom selben Krankenhaus, gefunden werden.

In dieser Arbeit wurden für die insgesamt 212 untersuchten *C. albicans*-Stämme 87 unterschiedliche PCR-Fingerprint-Genotypen nachgewiesen. Die „typischen“ *C. albicans*-Isolate aus Deutschland, Portugal und Angola hatten nahezu identische phänotypische Eigenschaften, konnten aber 81 verschiedenen Genotypen zugeordnet werden. Die typischen *C. albicans*-Populationen aus Europa und Afrika zeigten zwar keine grundsätzlich verschiedenen PCR-Muster, zwischen den unterschiedlichen Populationen wurden aber bis auf eine Ausnahme keine völlig übereinstimmenden Genotypen beob-

achtet. Bei den 22 atypischen Stämmen aus Angola und Madagaskar wurden 6 Genotypen bestimmt, wobei aber die meisten Stämme (15) einen einheitlichen Genotyp hatten. Die europäischen Populationen erwiesen sich als weitaus variabler als die typischen und atypischen Populationen aus Afrika.

Die geringere genetische Variabilität der typischen afrikanischen und, in noch stärkerem Maße, der atypischen *C. albicans*-Populationen aus verschiedenen Regionen Afrikas wurde durch populationsgenetische Analysen mittels unabhängiger molekularer Marker bestätigt (Forche 1998). Die Ursache dafür ist noch unklar. Da Schmierinfektionen und sexuelle Übertragungen in diesen Gebieten eine große Rolle spielen, könnten dadurch bestimmte Stämme bzw. Klone verbreitet werden und zirkulieren, was die geringere Heterogenität innerhalb der „normalen“ angolanischen *C. albicans*-Population erklären könnte. Andererseits werden für *C. albicans* überwiegend klonale Populationsstrukturen beschrieben (Boerlin et al. 1996, Gräser et al. 1996, Pujol et al. 1993), da für diese diploide Hefen bisher keine sexuellen Vermehrungsformen gefunden wurden. Für Klonalität sprechen auch die in dieser Studie in allen Populationen gefundenen überrepräsentierten Genotypen. Möglicherweise handelt es sich bei den afrikanischen *C. albicans* um wenige, aber relativ stabile Klone.

Unsere Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß eine gewisse, allerdings statistisch nicht abgesicherte Korrelation zwischen dem Genotyp und der geographischen Herkunft der Stämme besteht. Möglicherweise sind die engeren Beziehungen zwischen den afrikanischen und portugiesischen Stämmen, wie sie im Komplex II zu sehen sind, dadurch bedingt, daß viele der portugiesischen Patientinnen afrikanischen Ursprungs sind bzw. daß durch Einwanderer „afrikanische“ Stämme in größerer Anzahl nach Portugal gelangt sind.

4.3 Vergleichende Untersuchung von *Candida*-Stämmen isoliert von Patientinnen mit Vaginalcandidose und ihren Partnern

Klinische Vaginitis wird häufig durch *C. albicans* verursacht, wobei die betroffenen Patientinnen oft rezidivierende Episoden dieser Erkrankung durchmachen. Die Ursachen für diese Rezidive sind noch nicht völlig geklärt. Es wird angenommen, daß gesunde Frauen mit *C. albicans* kolonisiert sind und daß Stämme in ihrer anorektalen Region, oder kommensale Stämme des Partners oder ein persistierender Stamm in der Vagina die

Ursache für die nach Therapie wieder aufflammenden klinischen Symptome sind.

Einige Autoren nehmen an, daß gesunde Frauen Trägerinnen von kommensalen *Candida*-Stämmen sind und daß diese Stämme das ätiologische Agens bei späteren Episoden von Vulvovaginalinfektionen als Folge physiologischer Veränderungen bzw. von einer Abschwächung der Immunabwehr beim Wirt sind. Bei diesen Patientinnen wird der ursprüngliche Stamm ohne genetische Veränderungen erhalten ([Maffei et al. 1997](#), [Lockhart et al. 1996](#)). In einer Langzeitbeobachtung wurden insgesamt 10 Frauen mit rezidivierender Vulvovaginalcandidose in einem Zeitraum von 24 bis 47 Monaten untersucht ([Vazquez et al. 1994](#)). Durch Karyotypie konnten für die *Candida albicans*-Vaginalisolate, trotz des langen Beobachtungszeitraums und zahlreicher antimykotischer Therapieversuche, fast immer die gleichen Genotypen nachgewiesen werden. In den zwei Fällen, bei denen ein Stammaustausch stattfand, wurden die neuen Stämme dann wieder über einen längeren Zeitraum nachgewiesen. Zu ähnlichen Ergebnissen führte auch die Untersuchung von 2 Frauen und ihren Partnern ([Schröppel et al. 1994](#)), bei der in einem Fall der gleiche Stamm, mit geringeren Veränderungen, in jeder weiteren Vaginitis-Episode wieder gefunden wurde, während in dem anderen Falle ein Stammaustausch stattfand. Die Tatsache, daß in verschiedenen Studien, im Laufe nachfolgender Vaginitis-Episoden, immer geringfügige Veränderungen bei den „Infektionsstämmen“ festgestellt wurden ([Schröppel et al. 1994](#), [Vazquez et al. 1994](#), [Mercure et al. 1993](#), [Schmid et al. 1993](#), [Soll et al. 1991](#), [Soll et al. 1988](#)), spricht dafür, daß die „Infektionsstämmen“ von rezidivierenden *Candida*-Vaginosen genetisch nicht stabil sind. Die Antimykotikabehandlung kann sowohl zur Selektion von Varianten des früheren Infektionsstammes als auch zum Austausch gegen einen genetisch unterschiedlichen Stamm führen, dessen Quelle der männliche Partner sein kann.

Von den 12 Frauen in unserer Studie, bei denen *Candida*-Stämmen aus der Vagina und anderen Körperregionen, wie Stuhl und Mundhöhle, gleichzeitig isoliert wurden, wiesen 8 Patientinnen identische Stämme auf. Bei den übrigen 4 Patientinnen wurden unterschiedliche Stämme isoliert. Dieses Ergebnis stimmt gut mit früheren Befunden unserer Arbeitsgruppe überein. Im Rahmen einer epidemiologischen Studie von *C. albicans*-Isolaten von immunsupprimierten Patienten wurde gezeigt, daß zwei Drittel dieser Patienten mit identischen *C. albicans*-Stämmen besiedelt bzw. infiziert waren, während von einem Drittel der Patienten unterschiedliche Isolate nachgewiesen wurden ([Schönian et al. 1996](#)).

Bei drei Patientinnen (1/4, 1/5, 9/7) wurden morphologisch unterschiedliche Vaginalisolate untersucht, die sich im PCR-Fingerprinting als genetisch identisch erwiesen. Andere Autoren haben ähnliche Befunde erhoben. [Soll \(1988\)](#) beschrieb unterschiedliche *Candida*-Stämme der gleichen Spezies bei einem knochenmarktransplantierten Patienten im Verlauf einer systemischen Infektion. Bei der Überprüfung der genetischen Verwandtschaft von Stämmen, die aus 17 verschiedenen Körperregionen gesunder Frauen (insbesondere aus der Mundhöhle, aus der vulvovaginalen und anorektalen Region) isoliert worden waren, wurden nur bei etwa 52% der Frauen identische Isolate an verschiedenen Standorten gefunden ([Soll et al. 1991](#)). Die übrigen Frauen waren durch unterschiedliche oder ähnliche, aber nicht identische Stämme besiedelt. Es wird vermutet, daß ähnliche Isolate durch genetische Divergenz von einem gleichen Ausgangsstamm entstanden sind. In unserer Studie wurden bei 3 der 5 asymptomatischen Frauen neben dem Vaginalisolat auch Isolate aus anderen Körperregionen nachgewiesen, die bei 2 von ihnen identisch und bei einer unterschiedlich waren. Bei den beiden anderen Frauen (9/6 und 9/18) wurde *Candida*-Stämme nur aus der Vagina isoliert, die somit nur mit den Partnerisolaten verglichen werden konnten. Andererseits fanden Soll und Mitarbeiter eine verminderte genetische Variabilität bei den in ihrer Studie analysierten Vaginalisolaten, was auf eine mögliche Adaptation dieser Stämme an ihren Standort hinweisen könnte. Ähnliche Schlußfolgerungen können aus unseren Ergebnissen nicht gezogen werden, da nur bei 4 unserer 12 Patientinnen unterschiedliche Isolate in den verschiedenen Körperregionen nachgewiesen wurden.

Bei 9 der 17 Patientinnen, bei deren Partnern *Candida* aus dem Sperma, dem Stuhl und/oder der Mundhöhle isoliert wurden, stimmten die PCR-Fingerprints der Isolate von beiden Partnern überein (bei einer Patientin war das Vaginalisolat mit dem Isolat aus Sperma und Stuhl des Partners identisch, bei 3 Patientinnen wurden gleiche PCR-Profile für die Isolate aus Vagina und Sperma nachgewiesen, bei weiteren 3 Patientinnen stimmte das Vaginalisolat mit dem Isolat aus dem Stuhl des Partners überein, bei einer Patientin zeigten das Vaginalisolat und das Isolat aus dem Mund ihres Partners gleiche PCR-Muster und in einem Falle waren die Stuhlisolate beide Partner übereinstimmend im PCR-Profil).

[Schmid et al.](#) haben 1993 eine höhere Quote von identischen Stämmen (8 von 10) bei Partneruntersuchungen nachgewiesen. In seiner Studie zeigten alle 10 Frauen klinische Symptome einer Vaginitis. Im Gegensatz dazu, haben wir in unserer Studie eine ge-

mischte Population analysiert. Von den 12 Frauen mit Vaginitissymptomatik hatten 6 identische Stämme wie ihre Partner, während bei den 5 asymptomatischen Frauen keine identischen Stämme bei ihren Partnern nachgewiesen werden konnten. Bei den 4 Frauen ohne klinische Angaben stimmten bei 2 Patientinnen die Vaginalisolate und bei einer Patientin das Stuhlisolat mit den entsprechenden Partnerisolaten überein.

Der Befund, daß es keine besonderen Genotypen gibt, die in direktem Zusammenhang mit der Pathogenität bei *C. albicans* stehen, stimmt mit früheren Beobachtungen überein ([Lunel et al. 1998](#), [McCullough et al. 1996](#), [Meusel 1996](#), [Schönian et al. 1993a-b](#)). Das bedeutet, daß gleiche oder sehr ähnliche Stämme sowohl für die Besiedlung als auch für die Infektion des Vaginaltrakts verantwortlich sein können.

Bei 2 Patientinnen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten *Candida*-Spezies in der Vagina nachgewiesen. Bei Patientin 1/2 wurden verschiedene Isolate während zweier Vaginitis-Episoden beobachtet. Während jeder Episode stimmten die Isolate allerdings mit denen ihres Partners überein. Bei Patientin 9/5 wurden identische oder zumindest sehr ähnliche PCR-Fingerprints für die *C. albicans*-Stämme nachgewiesen, die während drei Episoden einer rezidivierenden Vaginitis isoliert wurden. Diese *C. albicans*-Stämme unterschieden sich jedoch von allen Isolaten, die vom Partner stammten.

In einer vergleichbaren Studie zur rezidivierenden Vulvovaginalcandidose haben [Mercure et al. 1993](#) unter Verwendung von Bio- und DNA-Typisierungsmethoden keine Bio- oder Genotypen gefunden, die mit den rezidivierenden Prozessen oder die mit bestimmten Körperregionen assoziiert waren. Bei den Patientinnen persistierten in der Regel ähnliche Stämme in verschiedenen Körperregionen. Außerdem sprach die Rückfallrate von 86% dafür, daß meisten dieser Vaginalinfektionen eine endogene Quelle haben müssen.

Die zwei in unserer Studie untersuchten Fälle von rezidivierenden *Candida*-Vaginosen lassen keinen Schluß auf die möglichen Ursachen dieser Rezidive zu. Identische oder zumindest sehr ähnliche Stämme in den unterschiedlichen Episoden würden für eine endogene Ursache, unterschiedliche Stämme für eine exogene Übertragung sprechen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob und wenn ja in welcher Form molekularbiologische Methoden eine sinnvolle Ergänzung der konventionellen mykologischen Diagnostik bei Problemfällen und bei epidemiologischen Studien, insbesondere für *Candida* spp., darstellen können.

Aufgrund ihrer Bedeutung als allgemeiner, humanpathopotenter Erreger hat *C. albicans* größere Aufmerksamkeit auf sich gezogen als andere *Candida*-Spezies. Studien zur Epidemiologie von *Candida*-Infektionen waren bisher durch das Fehlen zuverlässiger und einfach durchführbarer Typisierungssysteme beschränkt. Bis vor kurzem war z.B. nur wenig über die Ätiologie und die Epidemiologie der durch *Candida* verursachten Vaginitis bekannt, da die Möglichkeiten für einen Vergleich unabhängiger Isolate auf genetischer Ebene fehlten. In der Vergangenheit erfolgte die Stammdifferenzierung meist mittels Biotypisierung, aber diese Methode vergleicht Phänotypen und läuft deswegen in Gefahr, genetisch ähnliche aber phänotypisch unterschiedliche Stämme zu trennen und andererseits genetisch unterschiedliche aber phänotypisch identische Stämme zusammenzufassen. Dieses Problem wurde mit der Entdeckung des reversiblen „switching“ Systems, welches den Phänotyp von *C. albicans* bei nahezu unverändertem Genotyp dramatisch verändern kann, besonders deutlich.

Molekulargenetische Methoden zur Charakterisierung von *Candida*-Spezies haben in den letzten Jahren einen großen Aufschwung genommen. Große Fortschritte wurden mit Hilfe dieser Techniken bei der Klärung von Taxonomie und Epidemiologie unterschiedlicher *Candida*-Spezies erreicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche molekularbiologische Methoden für die Identifizierung konventionell schwer differenzierbarer *Candida*-Arten und für den Vergleich von *C. albicans*-Stämmen eingesetzt. Bei der PCR-Fingerprint-Technik werden durch den Einsatz einzelner unspezifischer Primer Muster von Amplifikationsprodukten unterschiedlicher Größe erzeugt. Diese PCR-Muster sind generell speziesspezifisch, weisen aber auch stammspezifische Unterschiede auf. Durch Vergleich mit den Amplifikationsprofilen entsprechender Referenzstämme gestattet das PCR-Fingerprinting eine Speziesidentifizierung bei humanpathogenen Pilzen auch dann, wenn konventionelle Methoden versagen. Für die Charakterisierung von *Candida*-Isolaten haben sich die Primer T3B, dessen Sequenz aus dem intergenischen Spacer

der tDNA stammt, und M13 Core-Sequenz, der sich an Minisatelliten-DNA anlagert, besonders bewährt. Mit beiden Primern können sowohl Spezies- als auch Stammunterschiede nachgewiesen werden. Für eine Identifizierung von *Candida*-Isolaten auf Speziesebene ist die Analyse der „Internal Transcribed Spacer“-Region (ITS), die im ribosomalen Operon zwischen den Genen für die 18S rRNA und die 26S rRNA liegen und die das 5.8S rRNA-Gen einschließen, gut geeignet. Durch Amplifikation mit pilzspezifischen Primern und anschließendem Verdau des PCR-Produkts mit häufigschneidenden Restriktionsenzymen können die verschiedenen *Candida*-Spezies voneinander unterschieden werden. Diese Technik weist zwar keine Stammunterschiede nach, kann aber für den Nachweis und die Speziesidentifizierung direkt im klinischen Material, ohne vorherige Anzucht der Hefen, eingesetzt werden.

Beide molekularbiologischen Verfahren wurden in der vorliegenden Arbeit für Unterscheidung von routinemäßig schwer differenzierbaren klinischen *Candida famata* und *Candida guilliermondii*-Isolaten genutzt. Parallel wurden bei allen Isolaten die Pseudomyzelbildung auf Reisagar sowie die biochemischen Eigenschaften mit dem API ID 32C-System überprüft. Molekularbiologisch konnten von insgesamt 37 fraglichen Stämmen 31 als *C. guilliermondii* und 3 als *C. famata* identifiziert werden, die drei verbliebenen Stämme waren mit diesen Techniken wegen fehlender Referenzstämme nicht identifizierbar. Mit der Biochemotypie gelang nur die Zuordnung eines der drei *C. famata*-Isolate sowie von 23 der 31 *C. guilliermondii*-Isolate. 14 Isolate wurden mit den konventionellen Methoden gar nicht oder falsch identifiziert. Zu diesem Ergebnis trug besonders die fehlende bzw. fragliche Pseudomyzelbildung bei fast allen untersuchten Stämmen bei, die somit in unserem Stammgut ein völlig unzureichendes Kriterium für die Diskriminierung von *C. guilliermondii* und *C. famata* darstellte.

Mit dem PCR-Fingerprinting wurde auch die Spezieszugehörigkeit phänotypisch veränderter *Candida albicans*-Isolate überprüft. Alle atypischen Stämmen wurden trotz des Fehlens solcher für *C. albicans* charakteristischer Merkmale wie der Bildung von Chlamydosporen, der Verwertung der Aminosucker N-Acetylglukosamin und Glukosamin sowie der Assimilation von 2-Ketogluconat und Xylose als *C. albicans* identifiziert. Eine exakte Spezies-Differenzierung mittels phänotypischer oder genotypischer Merkmale ist notwendig, da es z. B. in Deutschland noch keine Standardisierung von Resistenztestungen für Sproßpilze gibt und die Wahl des Antimykotikums unter anderem von der isolierten *Candida*-Spezies abhängt.

Unsere Studie hat gezeigt, daß die Methode der biochemischen Typisierung dann Grenzen hat, wenn typische Stoffwechselreaktionen nicht nachgewiesen werden können. Zum Ausfall derartiger Stoffwechselleistungen kann es sowohl durch Einzelmutationen in den Genen als auch durch die Hemmung der Expression der beteiligten Enzyme durch verschiedene Umweltfaktoren kommen. Genetische Methoden, insbesondere die Fingerprint-Techniken, die auf der Analyse mehrerer Genomabschnitte beruhen, sind dagegen in der Lage, auch Isolate mit veränderten morphologischen und physiologischen Eigenschaften sicher nachzuweisen.

Bei 6 verschiedenen *Candida albicans*-Populationen aus Angola (2 Populationen), Madagaskar, Deutschland (2 Populationen) und Portugal wurde die Variabilität phänotypischer und genotypischer Merkmale untersucht, wobei in diese Analyse neben *C. albicans*-Stämmen mit normalem Biotyp auch atypische Stämme miteinbezogen wurden. Während die phänotypischen Eigenschaften, bis auf die der atypischen Stämme, kaum variierten, wurden für die insgesamt 212 *C. albicans*-Isolate 87 unterschiedliche PCR-Fingerprint-Genotypen nachgewiesen. Dabei erwiesen sich die europäischen Populationen als weitaus variabler als die typischen und atypischen Populationen aus Afrika. Die typischen *C. albicans*-Populationen aus Europa und Afrika zeigten zwar keine grundsätzlich verschiedenen PCR-Muster, zwischen den unterschiedlichen Populationen wurden aber bis auf eine Ausnahme keine völlig übereinstimmenden Genotypen beobachtet. Die Analyse der Beziehungen zwischen den Fingerprint-Genotypen mit der UPGMA-Distanz-Methode ergab, daß die meisten Stämme zwei großen Gruppen, wenn auch statistisch nicht gesichert, zugeordnet werden können. Im Komplex I waren die meisten Stämme aus Berlin und München und im Komplex II viele afrikanische Stämme mit normalem Biotyp (AT) sowie fast alle portugiesischen Stämme (PO) zu finden. Alle atypischen Stämme aus Afrika bildeten einen gut separierten dritten Komplex. Die Ergebnisse des PCR-Fingerprintings unterstützen die Hypothese einer primär klonalen Populationsstruktur bei *C. albicans*, die basierend auf den Ergebnissen der Isoenzymanalysen und der Analyse anonymer PCR-Marker aufgestellt wurde.

Rezidivierende Episoden bei *Candida*-Vaginitis können sowohl durch Persistenz der Erreger nach Therapie als auch durch Reinfektion mit neuen Stämmen entstehen. In der vorliegenden Arbeit wurden *C. albicans*-Vaginalisolate mit Stämmen, die aus verschiedenen Körperregionen der Patientinnen und ihrer Partner stammten, miteinander verglichen. Dabei waren zwei Drittel der Frauen mit identischen *C. albicans*-Stämmen

besiedelt bzw. infiziert, während von einem Drittel der Patientinnen unterschiedliche Stämme isoliert wurden. Bei etwa der Hälfte Patientinnen wurden identische Isolate bei ihren Partnern nachgewiesen. Bei einer Patientin wurden verschiedene Isolate während zweier Vaginitis-Episoden beobachtet, die jedoch jeweils mit denen ihres Partners übereinstimmten. Bei einer anderen Patientin wurden während drei Episoden einer rezidivierenden Vaginitis identische oder zumindest sehr ähnliche *C. albicans*-Stämme isoliert, die sich aber von allen Isolaten ihres Partners unterschieden. Wir können also anhand unserer Ergebnisse zeigen, daß ein Stammaustausch zwischen den Partnern möglich ist, eine Reinfektion durch einen neuen Stamm stattfinden kann oder, daß ein Stamm ohne oder mit geringfügigen genotypischen Veränderungen trotz Therapie persistieren kann.

Das Problem der Erregeridentifizierung in der mykologischen Labordiagnostik ist sowohl klinisch als auch epidemiologisch (Erregerwandel) relevant. Molekularbiologische Methoden sollen gut funktionierende konventionelle Methoden zur Erregeridentifizierung nicht ersetzen, können aber bei Problemfällen eine wertvolle Ergänzung für die dermatomykologische Diagnostik vorzugsweise in fachständigen Referenzlaboratorien darstellen.

LITERATUR

001. Auger, P., Dumas, C., Joly, J. (1979). A study of 666 strains of *Candida albicans*: correlation between serotype and susceptibility to 5-fluorocytosine. J. Infect. Dis. 139:590-4.
002. Bauer, T. M., Ofner, E., Just, H. M., Just, H., Faschner, F. D. (1990). An epidemiological study assessing the relative importance of airborne and direct contact transmission of microorganisms in a medical intensive care unit. J. Hosp. Inf. 15:301-9.
003. Baumgartner, C., Freydiere, A. M., Gille, Y. (1996). Direct identification and recognition of yeasts species from clinical material by using albicans ID and CHROMagar Candida plates. J. Clin. Microbiol. 34:454-456.
004. BIO MERIEUX. ID 32 C-Analytischer Profil Index. 1. Auflage. 1993.
005. Boerlin, P., Addo, M., Boerlin-Petzold, F., Durussel, C., Pagani, J. L., Chave, J. P., Bille, J. (1995a). Transmission of oral *Candida albicans* strains between HIV-positive patients. Lancet. 345(8956):1052-3.
006. Boerlin, F., Boerlin, P., Durussel, C., Addo, M., Pagani, J. L., Chave, J. P., Bille, J. (1995b). Cluster of oral atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users J. Clin. Microbiol. 33:1129-1135.
007. Boerlin, P., Boerlin-Petzold, F., Goudet, J., Durussel, C., Pagani, J. L., Chave, J. P., Bille, J. (1996). Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 34:1235-1248.
008. Bostock, A., Khattak, M., Matthews, R., Burnie, J. (1993). Comparison of PCR-Fingerprinting, bei random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. 139:2179-84.
009. Brawner, D. L., Anderson, G. L., Yuen K. Y. (1992). Serotype prevalence of *Candida albicans* from blood culture isolates. J. Clin. Microbiol. 30: 149-153.
010. Bregenzer, T., Evison-Eckstein, A. C., Frei, R., Zimmerli, W. (1996). Klinik und

- Prognose der Candidemien - Eine retrospektive Studie über 6 Jahre. Schweiz. Med. Wochenschr. 126:1829-1833.
011. Buchman, T. G., Rossier, M., Merz, W. G., Charache, P. (1990). Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I. Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus-specific gene. Surgery 108:338-347.
012. Burgener-Kairuz, P., Zuber, J. P., Jaunin, P., Buchman, T. G., Bille, J., Rossier, M. (1994). Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species-specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-a-demethylase (L1A1) gene fragment. J. Clin. Microbiol. 32:1902-1907.
013. Chu, W. S., Magee, B. B., Magee, P. T. (1993). Construction of an Sfi I macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. J. Bacteriol. 175:6637-6651.
014. Clemons, K. V., Shankland, G. S., Richardson, M. D., Stevens, D. A. (1991). Epidemiologic study by DNA typing of a *Candida albicans* outbreak in heroin addicts. J. Clin. Microbiol. 29:205-207.
015. Crampin, A. C., Matthews, R. C. (1993). Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP-90 gene fragment. J. Med. Microbiol. 39:233-238.
016. D'Antonio, D., Violante, B., Mazzoni, A., Bonfini, T., Capuani, M. A., D'Aloia, F., Iacone, A., Schioppa, F., Romano, F. (1998). A nosocomial cluster of *Candida inconspicua* infections in patients with hematological malignancies. J. Clin. Microbiol. 36:792-5.
017. Dick, J. D., Rosengard, B. R., Merz, W.G., Stuart, R. K., Hutchins, G. M., Saral, R. (1985). Fatal disseminated candidiasis due to amphotericin-B-resistant *Candida guilliermondii*. Ann. Intern. Med. 102:67-68.
018. Einsele, H., Hebart, H., Roller, G., Löffler, J., Rothenhöfer, I., Müller, C. A., Bowden, R. A., Van Burik, J. A., Engelhard, D., Kanz, L., Schumacher, U. (1997). Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular

- probes. J. Clin. Microbiol. 35:1353-1360.
019. Elie, C. M., Lott, T. J., Reiss, E. Morrison, C. J. (1998). Rapid Identification of *Candida* Species with Species-Specific DNA Probes. J. Clin. Microbiol. 36:3260-65.
 020. Flahaut, M., Sanglard, D., Monod, M., Bille, J., Rossier, M. (1998). Rapid detection of *Candida albicans* samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. J. Clin. Microbiol. 36:395-401.
 021. Forche, A. (1998). Populationsgenetische Analysen von *Candida albicans*-Populationen mittels anonymer DNA-Marker. Dissertation - Fachbereich 15 - Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Technischen Universität Berlin.
 022. Gardes, M., Bruns, T. D. (1993). ITS Primer with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2:113-118.
 023. Göttlicher, S. In: Sigurd Göttlicher und Harald Meyer (1997). Vulvovaginalmykose - Klinische Ergebnisse einer epidemiologischen Langzeitstudie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York.
 024. Gräser, Y., Meyer, W., Halle, E., Presber, W., Schönian, G. (1993). Optimization of a PCR-based assay for fingerprinting microorganisms. Med. Microbiol. Lett. 2:379-385.
 025. Gräser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schönian, G., Presber, W., Mitchell, T. G., Vilgalys, R. (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 29;93(22):12473-7.
 026. Gräser, Y., Tietz, H-J., Vilgalys, R., Mitchell, T. G., Forche, A., Presber, W., Schönian, G. (1997). Detection and application of DNA polymorphism to identify species and strains of *Candida* and to analyze the population structure of *C. albicans*. Microbiol. Cult. Coll. 13:11-20.
 027. Greenfield, R. A., Bussey, M. J., Stephens, J. L., Jones, J. M. (1983). Serial

- enzyme-linked immunosorbent assays for antibody to *Candida* antigens during induction chemotherapy for acute leukemia. J. Infect. Dis. 148:275-83.
028. Hasenclever, H. F., Mitchell, W. O. (1961). Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. J. Bacteriol. 82:570-3.
 029. Hazen, K. C. (1995). New and emerging yeast pathogens. Clin. Microbiol. Res. 8:462-478.
 030. Hoegl, L., Schönián, G., Ollert, M., Korting, H. C. (1998). *Candida sake*: a relevant species in the context of HIV-associated oropharyngeal candidosis? J. Mol. Med. 76:70-3.
 031. Holmes, A. R., Cannon, R. D., Shepherd, M. G., Jenkinson, H. F. (1994). Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. J. Clin. Microbiol. 32:228-231.
 032. Hopfer, R. L., Walden, P., Setterquist, S., Highsmith, W. E. (1993). Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. J. Med. Vet. Mycol. 31:65-75.
 033. Hunter, P. R., Fraser, C. A., Mackenzie, D. W. (1989). Morphotype markers of virulence in Human *candidal* infections. J. Med. Microbiol. 28:85-91.
 034. Jitsurong, S., Kiamsiri, S., Pattararangrong, N. (1993). New milk medium for germ tube and chlamydoconidia production by *Candida albicans*. Mycopathologia 123:95-98.
 035. Kann, V. L. (1993). Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. J. Infect. Dis. 168:779-783
 036. Kerkmann, M. L., Schuppler, M., Paul, K. D., Schoenian, G., Smith, M. T. (1999). Red-pigmented *Candida albicans* in patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 37:278.
 037. Kitch, T. T., Jacobs, M. R., McGinnis M. R., Appelbaum, P. C. (1996). Ability of RapID Yeast Plus System to identify 304 clinically significant yeasts within 5 hours. J. Clin. Microbiol. 34:1069-1071.

038. Kunzelmann, V., Tietz, H.-J., Roßner, Dagmar, Czaika, V., Hopp, M., Schmalreck, A., Sterry, W. (1996). Prerequisites for an effective treatment of chronic recurrent vaginal candidosis. *Mycoses* 39 (Suppl. 1), 65-72.
039. Kurtzman, C. P., Robnett, C. J. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35:1216-23.
040. Kwon-Chung, K. J., Riggsby, W. S., Uphoff, R. A., Hicks, J. B., Whelan, W. L., Reiss, E., Magee, B. B., Wickes, B. L. (1989). Genetic differences between type I and type II *C. stellatoidea*. *Infection and Immunity*. 57:527-532.
041. Kwon-Chung, K. J., Hicks, J. B., Lipke, P. N. (1990). Evidence that *Candida stellatoidea* type II is a mutant of *Candida albicans* that does not express sucrose-inhibitable α -Glucosidase. *Infection and Immunity* 58:2804-2808.
042. Kwon-Chung, K. J., Bennett, J. E. (1992). In: Medical Mycology. Lea & Febiger Ed. Philadelphia, London.
043. Lagneau, P. E., Lebtahi, K., Swinne, D. (1996). Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. *Mycopathologia* 135:99-102.
044. Lehmann, P. F., Lin, D., Lasker, B. A. (1992). Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J. Clin. Microbiol.* 30:3249-3254.
045. Lieckfeldt, E., Meyer, W., Börner, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic Microbiol.* 33:413-426.
046. Lischewski, A., Merkert, H., Amann, R., Morschhäuser, J., Hacker, J. (1995). Konstruktion und Charakterisierung einer Oligonukleotidsonde zum spezifischen Nachweis von *Candida albicans* und *Candida tropicalis*. Abstract. 29. Wissenschaftliche Tagung der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft. Dresden, 7.-10. September 1995.
047. Lockhart, S. R., Reed, B. D., Pierson, C. L., Soll, D. R. (1996). Most frequent scenario for recurrent *Candida* vaginitis is strain maintenance with "substrain

- shuffling": demonstration by sequential DNA fingerprinting with probes Ca3, C1, and CARE2. *J. Clin. Microbiol.* 34:767-777.
048. Lott, T. J., Kuykendall, R. J., Reiss, E. (1993). Nucleotide sequence analysis of the 5.8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species. *Yeast*. 9:199-206.
 049. Lunel, F. V., Licciardello, L., Stefani, S., Verbrugh, H. A., Melchers, W. J. G., Meis, J. F. G. M., Scherer, S., Van Belkum, A. (1998). Lack of consistent short sequence repeat polymorphism in genetically homologous colonizing and invasive *Candida albicans* strains. *J. Bacteriol.* 180:3771-3778.
 050. Maffei, C. M., Paula, C. R., Mazzocato, T. S., Franceschini, S. (1997). Phenotype and genotype of *Candida albicans* strains isolated from pregnant women with recurrent vaginitis. *Mycopathologia* 137:87-94.
 051. Magee, B. B., D'Souza, T. M., Magee, P. T. (1987). Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. *J. Bacteriol.* 169:1639-43.
 052. Magee, P. T., Bowdin, L., Staudinger, J. (1992). Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 30:2674-2679.
 053. Maiwald, M., Kappe, R. H., Sonntag, G. (1994). Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Med. Vet. Mycol.* 32:115-122.
 054. Makimura, K., Murayama, S. Y., Yamaguchi, H. (1994). Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* 40:358-364.
 055. Martin, M. V., Lamb, D. J. (1982). Frequency of *Candida albicans* serotype in patients with denture-induced stomatitis and in normal denture wearers. *J. Clin. Pathol.* 35:888-91.
 056. Mason, A. B., Brandt, M. E., Buckley, H. R. (1989). Enolase activity associated with a *C. albicans* cytoplasmic antigen. *Yeast* 5:231-9.
 057. McCullough, M., Ross, B., Reade, P. (1995). Characterization of genetically

- distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. J. Clin. Microbiol. 33:696-700.
058. McCullough, M. J., Ross, B. C., Reade, P. C. (1996). *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. Int J. Oral Maxillofac. Surg. 25:136-144. © Munksgaard, 1996.
059. McGinnis, M. R., Ajello, L., Beneke, E. S., Drouhet, N. L. E., Goodman, C. J. H., Haley, L. D., Kane, J., Land, G. A., Padhye, A. A., Pincus, D. H., Rinaldi, M. G., Rogers, A. L., Slakin, I. F., Schell, W. A., Weitzman, I. (1984). Taxonomic and nomenclatural evaluation of the genera *Candida* and *Torulopsis*. J. Clin. Microbiol. 20:813-814.
060. Mendling, W. (1993). Diagnostik bei Vulvovaginalmykosen. In „Weissenbacher - Fluorpraktikum“ 1. Auflage 77-98. Medifact Mrugalla Verlag KG.
061. Mercure, S., Poirier, S., Lemay, G., Auger, P., Montplaisir, S., Repentigny, L. (1993). Application of biotyping and DNA typing of *Candida albicans* to the epidemiology of recurrent vulvovaginal candidiasis. J. Infect. Dis. 168:502-507.
062. Merlino, J., Tambosis, E., and Veal, D. (1998). Chromogenic tube test for presumptive identification or confirmation of isolates as *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 36:1157-1159.
063. Merz, W. G., Connelly, C., Hieter, P. (1988). Variation of electrophoretic karyotypes among clinical isolates of *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 26:842-5.
064. Metzgar, D., Van Belkum, A., Field, D., Haubrich, R., Wills, C. (1998). Random amplification of Polymorphic DNA and microsatellite genotyping of pre- and posttreatment isolates of *Candida* spp. from human immunodeficiency virus-infected patients on different fluconazole regimens. J. Clin. Microbiol. 36:2308-2313.
065. Meusel, O. (1996). Differenzierung klinischer *Candida albicans*-Isolate mittels PCR-Fingerprinting. Dissertation - Medizinische Fakultät (Charité) der HUB.

066. Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z., Vilgalys, R. (1993). Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 31:2274-2280.
067. Meyer, W., Mitchell, T. G. (1995). Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. Electrophoresis 16:1648-1656.
068. Miyakawa, Y., Mabuchi, T., Kagaya, K., Fukazawa, Y. (1992). Isolation and characterization of a species-specific DNA for detection of *Candida albicans* by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 30:894-900.
069. Miyakawa, Y., Mabuchi, T., Fukazawa, Y. (1993). New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31:3344-3347.
070. Morace, G., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Lo Cascio, G., Fadda, G. (1997). Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-restriction enzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 35:667-672.
071. Nei, M., Li, H. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5269-5273.
072. Nguyen, M. H., Peacock, J. E. Jr., Morris, A. J., Tanner, D. C., Nguyen, M. L., Snyderman, D. R., Wagener, M. M., Rinaldi, M. G., Yu, V. L. (1996). The changing face of Candidemia: Emergence of Non-*Candida albicans* Species and Antifungal Resistance. Am. J. Med. 100:617-623.
073. Nho, S., Anderson, M.J., Moore, C. B., Denning, D. W. (1997). Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and HhaI digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. J. Clin. Microbiol. 35:1036-1039.
074. Niesters, H. G. M., Goessens, W. H. F., Meis, J. F. M. G., Quint, W. G. V. (1993). Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 31:904-910.

- 075. Nishikawa, A., Tomomatsu, H., Sugita, T., Ikeda, R., Shinoda, T. (1996). Taxonomic position of clinical isolates of *Candida famata*. J. Med. Vet. Mycol. 34:411-419.
- 076. Nobre, G. (1996). Leveduras. In: „Arquivos do Instituto Bacteriológico Câmara Pestana“. XXI(2):27-43.
- 077. Odds, F. C. and Abbott, A. B. (1980). A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. Sabour. 18:301-317.
- 078. Odds, F. C. (1987). *Candida* infections: an overview. Crit. Rev. Microbiol. 15:1-5.
- 079. Odds, F. C. (1988). *Candida* and candidosis. 2nd edition. Baillière Tindall ed.
- 080. Odds, F. C., Auger, P., Kroch, P., Neely, A. N., Segal, E. (1989). Biotyping of *Candida albicans*: results of an international collaborative survey. J. Clin. Microbiol. 27:1506-9.
- 081. Odds, F. C. (1991). Long-term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. J. Med. Vet. Mycol. 29:413-415.
- 082. Odds, F. C. and Bernaerts, R. (1994). CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J. Clin. Microbiol. 32:1923-1929.
- 083. Odds, F. C., Rinaldi, M. G., Cooper, C. R., Fothergill, A. Jr., Pasarell, L., McGinnis, M. R. (1997). *Candida* and *Torulopsis*: a blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. J. Clin. Microbiol. 35:313-316.
- 084. Olsson, M., Elvin, K., Lofdahl, S., Linder, E. (1993). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31:221-226.
- 085. Perera, J. and Clayton, Y. (1994). Incidence, species distribution and antifungal sensitivity pattern of vaginal yeasts in Sri Lankan women. Mycoses 37:357-360.
- 086. Pfaller, M. A. (1987). Strain variation among *Candida* species: application of

- various typing methods to study the epidemiology and pathogenesis of candidiasis in hospitalized patients. *Inf. Control* 8:273-6.
087. Pfaller, M. A. (1989). Infection control: opportunistic fungal infections - the increasing importance of *candida* species. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 10:270-3.
 088. Pfaller, M. A., Cabezudo, I., Hollis, R. Huston, B., Wenzel, R. P. (1990). The use of biotyping and DNA fingerprinting in typing *Candida albicans* from hospitalized patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 13:481-489.
 089. Pfaller, M. A. (1995). Epidemiology of candidiasis. *J. Hosp. Infect.* 30(Suppl.):329-338.
 090. Pfaller, M. A., Lockhart, S. R., Pujol, C., Swails-wenger, J. A., Messer, S. A., Edmond, M. B., Jones, R. N., Wenzel, R. P., Soll, D. R. (1998). Hospital specificity, region specificity, and fluconazole resistance of *Candida albicans* bloodstream isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36:1518-1529.
 091. Pinjon, E., Sullivan, D., Salkin, I., Shanley, D., Coleman, D. (1998). Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 36:2093-2095.
 092. Polak, A. (1997). Antifungal Therapy, An Everlasting Battle. *Progress In Drug Research*, Vol. 49 (E. Jucker. Ed.). Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).
 093. Polonelli, L., Archibusacci, C., Sestito, M., Morace, G. (1983). Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J. Clin. Microbiol.* 17:774-780.
 094. Presber, W., Hegenscheid, B., Starke, R., Schönian, G. (1988) Trends in medical microbiology. I. Diagnosis of pathogenic markers. *Z. Gesamte Hyg.* 34:694-6.
 095. Pujol, C., Reynes, J., Renaud, F., Raymond, M., Tibayrenc, M., Ayala, F., Janbon, F., Mallié, M., Bastide, J. M. (1993). The yeast *Candida albicans* has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:9456-9459.
 096. Pujol, C., Renaud, F., Mallié, M., Meeûs, T. D., Bastide, J. M. (1997). Atypical

- strains of *Candida albicans* recovered from AIDS patients. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 35:115-121.
097. Quindos, G., Cabrera, F., Arilla, M. C., Burgos, A., Ortiz-Vigon, R., Ponton, J. (1994). Fatal *Candida famata* peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis who was treated with fluconazole. Clin. Infect. Dis. 18:658-60.
 098. Quindos, G., San Millan, R., Robert, R., Bernard, C., Ponton, J. (1997). Evaluation of Bichro-latex albicans, a new method for rapid identification of *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 35:1263-1265.
 099. Reagan, D. R., Pfaller, M. A., Hollis, R. J., Wenzel, R. P. (1990). Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe. J. Clin. Microbiol. 28:2733-2738.
 100. Rex, H. J., Rinaldi, M. G., Pfaller, M. A. (1995). Minireview: Resistance to *candida* species to fluconazole. Antimicrob. Agents Chemother. 39:1-8.
 101. Rinaldi, M. G. (1993). Biology and Pathogenicity of *Candida* Species. In „Candidiasis“ Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. Editor, Gerald P. Bodey 2nd ed. Raven Press NY 1-20.
 102. Rippon, J. W. (1982). Candidiasis and the pathogenic yeasts. In: Rippon JW. Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes. Philadelphia: W. B. Saunders Co. 565-94.
 103. Robert., F., Lebreton, F., Bougnoux, M. E., Paugam, A., Wassermann, D., Schlotterer, M., Tourte-Schaefer, C., Dupouy-Camet, J. (1995). Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiologically surveillance of a burn unit. J. Clin. Microbiol. 33:2366-2371.
 104. Rodrigues, E. G., Lirio, V. S., Lacaz, C. (1992). [Preservation of fungi and actinomycetes of medical importance in distilled water]. Preservacao de fungos e actinomicetos de interesse medico em água destilada. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 34:159-165.
 105. Sadhu, C., McEachern, M. J., Rustchenko-Bulgac, E. P., Schmid, J., Soll, D. R.,

- Hicks, J. B. (1991). Telomeric and dispersed repeat sequences in *Candida* yeasts and their use in strain identification. *J. Bacteriol.* 173: 842-850.
106. Salkin, I. F., G. A. Land, N. J. Hurd, and P. R. McGinnis. (1987). Evaluation of YeastIdent and Uni-Yeast-Tek yeast identification systems. *J. Clin. Microbiol.* 25:625–627.
107. Salkin, I. F., Pruitt, W. R., Padhye, A. A., Sullivan, D., Coleman, D., Pincus, D. H. (1998). Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 36:1467.
108. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Laboratory Press. 2nd ed. Cold Spring Harbor, USA.
109. Sanchez, M. L., Pfaller, M. A., Cabezudo, I., Bale, M., Buschelman, B. (1992). Diagnosis of disseminated candidiasis in hospitalized patients using the Cand-Tec latex agglutination assay. *Mycopathologia* 118:153-62.
110. Sander, A. (1997). Epidemiologie, Diagnostik und Therapie von systemischen Candidosen. *Mikrobiologie 7.Jg* 3:90-91.
111. San-Milán, R., Ribacoba, L., Pontón, J., Quindós, G. (1996). Evaluation of a commercial medium for identification of *Candida* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15:153-158.
112. Scherer, S. and Stevens, A. (1987). Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* 25:675-9.
113. Scherer, S. and Stevens, D. A. (1988). A *Candida albicans* dispersed, repeated gene family and its epidemiological applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1452-1456.
114. Scherer, S. and Magee, P. T. (1990). Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* 54:226-241.
115. Schmid, J., Voss, E., Soll, D. R. (1990). Computer-assisted methods for assessing strain relatedness in *Candida albicans* by fingerprinting with the moderately repetitive sequence Ca3. *J. Clin. Microbiol.* 28:1236-1243.

116. Schmid, J., Rotman, M., Reed, B., Pierson, C. L., Soll, D. R. (1993). Genetic similarity of *Candida albicans* strains from vaginitis patients and their partners. J. Clin. Microbiol. 31:39-46.
117. Schmid, J., Tay, Y. P., Wan, L., Carr, M., Parr, D., McKinney, W. (1995). Evidence for nosocomial transmission of *Candida albicans* obtained by Ca3 fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 33:1223-1230.
118. Schönian, G., Gräser, Y., Starke, R., Mehl, M., Presber, W., Hegenscheid, B. (1990). Trends in medical microbiology: gene probes in medical microbiology. Z. Gesamte Hyg. 36:466-70.
119. Schönian, G., Meusel, O., Tietz, H-J., Meyer, W., Gräser, Y., Tausch, I., Presber, W., Mitchell, T. G. (1993a). Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction. Mycoses. 36:171-9.
120. Schönian, G., Gräser, Y., Meusel, O., Meyer, W., Buchholz, P., Presber, W., Mitchell, T. G. (1993b). Application of PCR fingerprinting to epidemiological analysis of bacterial and fungal pathogens. In: Usage of PCR and alternative methods in infectious and genetic diseases. A. Rolfs et al. ed.
121. Schönian, G., Tietz, H-J., Thanos, M., Gräser, Y. (1996). Application of molecular biological methods for diagnosis and epidemiology of human fungal infections. Mycoses. 39 Suppl. 1:73-80.
122. Schönian, G., Gräser, Y., Tietz, H-J. (1997). Molekularbiologische Methoden bei der Diagnostik von Dermatomykosen. Haut Spectrum 1:3-4.
123. Schroppel, K., Rotman, M., Galask, R., Mac, K., Soll, D. R. (1994). Evolution and replacement of *Candida albicans* strains during recurrent vaginitis demonstrated by DNA fingerprinting. J. Clin. Microbiol. 32:2646-2654.
124. Shepherd, M. G., Poulter, R. T. M., Sullivan, P. A. (1985). *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity. Ann. Rev. Microbiol. 39:579-614.
125. Slutsky, B., Buffo, J., Soll, D. R. (1985). High frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. Science 230:666-9.
126. Sneath, P. H. A., Sokal, R. R. (1973). Numerical Taxonomy. W. H. Freeman, San

Francisco.

127. Sobel, J. D., Muller, G., Buckley, H. R. (1984). Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of *candidal* vaginitis. *Infection and Immunity* 44:576-580.
128. Soll, D. R., Staebell, M., Langtimm, C., Pfaller, M., Hicks, J., Rao, T. V. (1988) Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic infection. *J. Clin. Microbiol.* 26:1448-1459.
129. Soll, D. R., Galask, R., Schmid, J., Hanna, C., Mac, K., Morrow, B. (1991) Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida* spp. carried in different anatomical locations of the same healthy women. *J. Clin. Microbiol.* 29:1702-1710.
130. Soll, D. R. (1992). High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews* 5:183-203.
131. Soll, D. R. (1996). The emerging molecular biology of switching in *Candida albicans*. *ASM News* 62:415-420.
132. Stevens, D. A., Odds, F. C., Scherer, S. (1990). Application of DNA typing methods to *Candida albicans* epidemiology and correlations with phenotype. *Rev. Infect. Dis.* 12:258-66.
133. St.-Germain, G., Laverdiere, M. (1986). *Torulopsis candida*, a new opportunistic pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 24:884-885.
134. Sullivan, D., Bennett, D., Henman, M., Harwood, P., Flint, S., Mulcahy, F., Shanley, D., Coleman, D. (1993). Oligonucleotide fingerprinting of isolates of *Candida* species other than *C. albicans* and of atypical *Candida* species from human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2124-2133.
135. Sullivan, D. J., Westerneng, T. J., Bennett, D. E., Coleman, D. C. (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 141:1507-1521.
136. Sullivan, D., Haynes, K., Bille, J., Boerlin, P., Roderio, L., Lloyd, S., Henman, M.,

- Coleman, D. (1997). Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. J. Clin. Microbiol. 35:960-964.
137. Sullivan, D., Coleman, D. (1998). *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. J. Clin. Microbiol. 36:329-334.
 138. Swofford, D. L., Olsen, G. J. (1990). Phylogenetic reconstruction. In: Molecular systematic. Hillis and Moritz ed. Sinauer Associates Inc., publishers, Sunderland, MA, USA. 411-501.
 139. Thanos, M., Schönian, G., Meyer, W., Schweynoch, C., Gräser, Y., Mitchell, T. G., Presber, W., Tietz, H. J. (1996). Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR. J. Clin. Microbiol. 34:615-21.
 140. Tibayrenc, M. (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Advances in Parasitology 36:47-115.
 141. Tietz, H. J., Küssner, A., Thanos, M., De Andrade, M. P., Presber, W., Schönian, G. (1995). Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa. J. Clin. Microbiol. 33:2462-5.
 142. Tietz, H.-J. and Czaika, V. (1999). Osteomyelitis candidosa durch hochresistente *C. guilliermondii*. Mycoses. Im Druck.
 143. Timmins, E. M., Howell, S. A., Alsberg, B. K., Noble, W. C., Goodacre, R. (1998). Rapid differentiation of closely related *Candida* species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy. J. Clin. Microbiol. 36:367-374.
 144. Tsuchiya, T., Fukazaway, Y., Kawakita, S. (1961). Serological classification of the genus *Candida*. In: Studies on candidiasis in Japan. Tokyo. Research Committee of Candidiasis 34-46.
 145. Van Belkum, A., Melchers, W., De Pauw, B. E., Scherer, S., Quint, W., Meis, J. F. (1994). Genotypic characterization of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole-treated neutropenic patients. J. Infect. Dis. 169:1062-1070.
 146. Van Burik, J. A., Myerson, D., Schreckhise, R. W., Bowden, R. A. (1998).

- Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. J. Clin. Microbiol. 36:1169-1175.
147. Van De Peer, Y., De Wachter, R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for Microsoft Windows environment. Comput. Applic. Biosci. 10:569-570.
 148. Van Deventer, A. J. M., Goessens, W. H. F., Van Belkum, A., Van Vliet, H. J. A., Van Etten, E. W. M., Verbrugh, H.A. (1995). Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidiasis. J. Clin. Microbiol. 33:625-628.
 149. Vazquez, J. A., Sobel, J. D., Demetriou, R., Vaishampayan, J., Lynch, M., Zervos, M. J. (1994). Karyotyping of *Candida albicans* isolates obtained longitudinally in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. J. Infect. Dis. 170:1566-9
 150. Vilgalys, R., Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. J. Bacteriol. 172:4238-46
 151. Voss, A., Pfaller, M. A., Hollis, R. J., Rhine-Chalberg, J., Doebbeling, B. N. (1995). Investigation of *Candida albicans* transmission in a surgical intensive care unit cluster by using genomic DNA typing methods. J. Clin. Microbiol. 33:576-580.
 152. Wade, J. C. (1993). Epidemiology of *Candida* Infections. In: „Candidiasis: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment“, edited by G. P. Bodey. Raven Press, Ltd., New York © 1993.
 153. Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.
 154. Welsh, J., Pretzman, C., Postic, D., Saint-Girons, I., Baranton, G., McClelland, M. (1992). Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phyletic groups. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:370-377.
 155. Whelan, W. L., Kirsch, D. R., Kwon-Chung, K. J., Wahl, S. M., Smith, P. D.

- (1990). *Candida albicans* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: absence of a novel or hypervirulent strain. J. Infect. Dis. 162:513-518.
156. Wickes, B., Staudinger, J., Magee, B. B. Kwon-Chung K. J., Magee, P. T., Scherer, S. (1991). Physical and genetic mapping of *Candida albicans*: several genes previously assigned to chromosome 1 map to chromosome R, the rDNA-containing linkage group. Infect. Immun. 59:2480-2484.
157. Williams, D. W., Wilson, M. J., Lewis, M. A., Potts, A. J. (1995). Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. J. Clin. Microbiol. 33:2476-2479.
158. Williams, J. K. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
159. Williamson, M. I., Samaranayake, L. P., MacFarlane, T. W. (1986). Biotypes of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. J. Med. Vet. Mycol. 24: 81-84.
160. WWW-Server für *Candida albicans*: <http://alces.med.umn.edu/Candida.html> und <http://alces.med.umn.edu/candida/morph2.html>. Stand: Februar 1999.
161. Yarrow, D., Meyer, S. A. (1978). Proposal for the amendment of the diagnosis of the genus *Candida* Berkhout nom cons. Int. J. System. Bacteriol. 28:611-615.

ERKLÄRUNG AN EIDES STATT

Hiermit erkläre ich, daß ich die Dissertation selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt habe. Die Arbeit enthält, selbst in Teilen, keine Kopien anderer Arbeiten. Die benutzten Hilfsmitteln sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 22. Februar 1999

Manuel Vieira Dias Pinto de Andrade

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben: Manuel Vieira Dias Pinto de Andrade

geboren am 12.06.1959 in Luanda, Angola

Familienstand: verheiratet, 2 Söhne

Eltern: José Manuel de Andrade

Maria dos Mártires Vieira Dias de Andrade[†]

Ausbildung

1965-1978: Grundschule, Mittelschule und Gymnasium in verschiedenen Ortschaften Angolas.

1978-1979: Schule zur Studienvorbereitung in Luanda

1979-1986: Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät der Universität "Agostinho Neto" in Angola.

1986-1987: Praktikum in Huambo, Angola

1987-1988: Aufenthalt im Institut für Mikrobiologie, Bereich Medizin (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin zur Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema: "Methoden zur Untersuchungen von Pathogenitätsfaktoren bei Bakterien".

1988: Approbation als Arzt

1992-1997: Ausbildung zum Facharzt für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie im Institut für Mikrobiologie und Hygiene, im Mykologischen Labor der Hautklinik und im Institut für Virologie der Charité, Berlin

1995: Diplom "Tropenmedizin und Gesundheitswesen" vom Institut für Tropenmedizin, Berlin und Institut für Tropenhygiene und Öffentliches Gesundheitswesen, Universität Heidelberg.

Beruf:

1981-1988: Während des Medizinstudiums Tutor für Gesundheitswesen und Mikrobiologie an der Medizinischen Fakultät der Universität "Agostinho Neto" in Angola.

1988-1992: Assistent für Mikrobiologie an der Medizinischen Fakultät der Universität "Agostinho Neto" in Angola
Ärztliche Tätigkeiten in verschiedenen Krankenhäusern in Luanda und Huambo, Angola.

Seit 1992: Gast im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin.

Veröffentlichungen:

Tietz, H. J., Küssner, A., Thanos, M., De Andrade, M. P., Presber, W., Schönian, G. (1995). Phenotypic and genotypic characterization of unusual vaginal isolates of *Candida albicans* from Africa. J. Clin. Microbiol. 33:2462-5.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand von Februar 1996 bis Februar 1999 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Tietz, Leiter des Mykologischen Laboratoriums an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik, Charité, Berlin. Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité durchgeführt. Allen, die mein naturwissenschaftliches Interesse gefördert und mir während meines Aufenthaltes in Deutschland zur Seite gestanden haben, gilt mein sehr persönlicher Dank, besonders:

Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Tietz,

Leiter des Mykologischen Laboratoriums der Dermatologischen Klinik und Poliklinik, Charité. Für das Vertrauen, das er mir mit der Vergabe des Dissertationsthemas entgegenbrachte sowie die vielseitigen Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit bin ich ihm sehr dankbar. Insbesondere verdanke ich ihm die Kenntnisse über die konventionellen Techniken zur Identifizierung der *Candida*-Isolate.

Herrn Prof. Dr. med. W. Presber,

Leiter der Abteilung Parasitologie am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité. Er hat meinen Aufenthalt in Deutschland ermöglicht und mir somit die Gelegenheit gegeben, diese Arbeit durchführen zu dürfen. Danken möchte ich ihm auch für die bereitwillige Übernahme des Korreferats und die Korrektur des Manuskripts. Außerdem habe ich für seine ständige Unterstützung seit der Zeit als ich noch in meinem Heimatland Student war, ganz herzlich zu danken.

Frau Dr. rer. nat. Gabriele Schönian,

Leiterin des molekularbiologischen Laboratoriums der Abteilung Parasitologie am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit. Ihr gilt mein tief empfundener Dank für die Unterstützung in den vergangenen drei Jahren. Unter Ihrer Federführung entstanden die molekularbiologischen Resultate. Mit großem persönlichen Einsatz begleitete sie das Entstehen dieser Dissertation. Ohne ihren Rat, Ihre Geduld und Kritik wäre die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Dr. med. B. Graf,

für die konstruktiven Anregungen und ihre ständige Bereitschaft zur Klärung auftretender Fragen in der Fertigstellungsphase dieser Arbeit.

Für das gute Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Arbeitskollegen bedanken: Frau H. Melle, Frau W. Scholz, Frau C. Schweynoch, Frau M. Müller und Frau D. Pauli für die Unterstützung im labortechnischen Bereich sowie bei den Wissenschaftlern Herrn Dr. rer.nat. M. El Fari, Frau Dr. rer. nat. A. Forche und Frau Dr. rer. nat. Y. Gräser.